



PelvoCheck® CT/NG

Mode d'emploi

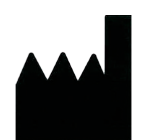


Kit pré-analytique pour la détection de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* dans des échantillons d'urine humaine ou des frottis vaginaux ou cervicaux.

RÉF 504 002

Pour un usage en diagnostic *in vitro*
par le personnel de laboratoire qualifié exclusivement

Révision : BQ-029-03
Décembre 2014



Greiner Bio-One GmbH
Maybachstr. 2 • 72636 Frickenhausen • Allemagne
Téléphone : +49 (0) 7022 948-0 • Télécopie : +49 (0) 7022 948-514
info@de.gbo.com • www.gbo.com/diagnostics



EXPLICATION DES SYMBOLES

	LOT			REF		IVD		Σ			!
en	Batch code	Use by	Consult Instructions for Use	Catalog Number	Manufacturer	In Vitro Diagnostic Medical Device	Temperature limitation	Contents sufficient for <n> tests	Danger	Store in the dark	Important Note
de	Chargenbezeichnung	Mindestens haltbar bis	Vor Gebrauch Anweisung lesen	Katalognummer	Hersteller	In-Vitro-Diagnostika Medizinprodukt	Temperaturbegrenzung	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Gefahr	Im Dunkeln lagern	Wichtiger Hinweis
fr	Numéro de lot	Date limite de conservation	Lire le mode d'emploi	Numéro de référence	Fabricant	Dispositif médical de diagnostic *in vitro*	Limite de température	Contenu suffisant pour <n> tests	Danger	À stocker à l'abri de la lumière	Remarque importante
es	Código de lote	A utilizar preferiblemente antes de	Antes de usar, lea las instrucciones	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitación de temperatura	Contenido suficiente para <n> ensayos	Peligro	Conservar en un lugar oscuro	Nota importante
it	Codice del lotto	Da utilizzare entro e non oltre	Leggere le istruzioni prima dell'uso	Numero catalogo	Produttore	Dispositivo medico-diagnostico in-vitro	Limitazione temperatura	Contenuto sufficiente per test <n>	Pericolo	Conservare al buio	Nota importante
pt	Código do lote	A utilizar preferívelmente antes de	Antes de usar, leia as instruções	Número de catálogo	Fabricante	Producto medicinal de diagnóstica in vitro	Limitação de temperatura	Conteúdo suficiente para <n> ensaios	Perigo	Conservar num local escuro	Aviso importante
nl	Lot nummer	Tenminste houdbaar tot	Gebruiksaanwijzing lezen	Catalogusnummer	Fabrikant	In vitro diagnostisch medisch product	Temperatuurbeperking	Voldoende inhoud voor <n> tests	Gevaar	Donker bewaren	Belangrijke opmerking
da	Lotnummer	Anvendes senest	Læs brugsanvisningen	Katalognummer	Producent	In vitro meskdicin doagnoseapparat	Temperaturbegraensær	Indeholder nok til <n> test	Fare	Opbevares mørkt	Vigtig henvisning
sv	Lot nummer	Sista förbrukningsdag	Läs bruksanvisningen före användning	Katalognummer	Tillverkare	In vitro-medicinsk doagnostisk apparatur	Temperatur-begränsning	Innehållet räcker till <n> tester	Fara	Förvaras mörkt.	Viktigt meddelande
pl	Kod partii	Termin zydatności	Przed użyciem przeczytać instrukcję	Numer katalogowy	Producent	Diagnostyka in vitro Produkt yw	Ograniczenie temperatury	Zawartość wystarcza na <n> testów	NIEBEZPIECZEŃSTWO	Przechowywać w ciemności	Ważne
no	batch nr.	holdbar til	Les bruksanvisning før bruk	katalognummer	produsent	in vitro-diagnostisk medisinsk utstyr	temperaturbegrensning	Innhold tilstrekkelig for <n> tester	Fare	Oppbevares mørkt	Viktig merknad
el	κωδικός παρτίδας	το λιγότερο διατηρείται	πριν την χρήση διαβάστε τις οδηγίες	Αριθμός Καταλόγου	Παραγωγός	In vitro διαγνωστικά ιατρικά προϊόντα	περιοριομός θερμοκραοίας	Περιεχόμενο αροκετό για <n> τεστ	ΚΊΝΔΥΝΟΣ	Αποθηκεύεται στα σκοτεινά	Σημαντική υπόδειξη
tr	Parti kodu	Son kullanma tarihi:	Kullanmadan önce talimatı okuyun	Katalog numarası	Üretici firma	In vitro diagnostik tıbbi tanı ürünü	Sıcaklık sınırlaması	İçeriği <n> test için yeterlidir	Tehlikeli	Karanlık yerde saklayınız	Önemli Not

TABLE DES MATIÈRES

1. COMPOSITION DU KIT

Kit de test PelvoCheck® CT/NG[1]	Contenu	Quantité
PCR MasterMix	5 Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix[2]	5 x 300 µL
Boîte de lames, 5 x 12 puces	1 boîte de lames Pelvo**Check**® CT/NG avec 5 puces Pelvo**Check**® CT/NG[3]	5 x 12 puces
Tampon d'hybridation	2 Pelvo**Check**® CT/NG Tampon d'hybridation	2 x 1 200 µL
Tampon A concentré	1 tampon A Pelvo**Check**® CT/NG concentré	1 x 55 mL
Tampon B concentré	1 tampon B Pelvo**Check**® CT/NG concentré	1 x 15 mL

[1] Un kit de test Pelvo**Check**® CT/NG suffit à analyser 60 échantillons.
[2] Contient tous les composants nécessaires pour la PCR, sauf la Taq ADN polymérase et l'uracil-N-glycosylase.
[3] Une puce Pelvo**Check**® CT/NG contient 12 micro-puces Pelvo**Check**® CT/NG.

2. CONSOMMABLES, ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL REQUIS

Il est recommandé d'utiliser Pelv**oCheck**® **CT/NG** conjointement aux consommables, équipements et matériels répertoriés et de n'autoriser qu'un personnel qualifié à les utiliser.

Consommables	Réf. Greiner Bio-One N°	Quantité
Pelv**oCheck**® CT/NG	504 002	Kit de test pour 60 réactions
Kit de pré-analytique Pelv**oCheck**® SAFE Kit de pré-analytique Pelv**oCheck**® STRAW Kit pré-analytique Pelv**oCheck**® Swab	453 100 453 101 453 103	50 échantillons 70 échantillons 60 échantillons
Kit d'extraction d'ADN/Préparation en colonne unitaire oCheck®	515 040	50 préparations
Pointes à filtre pour micropipettes stériles sans ADNase[4] Pointes à filtre 10 µL de faible rétention Pointes à filtre 100 µL de faible rétention Pointes à filtre 1 250 µL de faible rétention	771 265 737 261 750 265	96/960 96/960 96/768
Microtubes exempts d'ADNase Microtubes 1,5 mL Microtube 0,2 mL[5] 8 barrettes pour PCR de 0,2 mL Barrettes de bouchons pour 8 barrettes pour PCR de 0,2 mL	616 201 683 201 673 210 373 270	500/4000 500/1000 125/1250 125/1250
Tube en polypropylène de 50 mL[6]	210 261	25/450
Pipettes en plastique pour pipeteur Pipette de 10 mL Pipette de 25 mL Pipette de 50 mL	607 180 ou 607 160 760 180 ou 760 160 768 180 ou 768 160	1/200 1/200 1/200

[4] Certaines tailles de pointe citées sont en option en fonction des micropipettes disponibles.
[5] En principe, il est recommandé d'utiliser des barrettes de 8 tubes pour PCR. Les microtubes simples (0,2 mL) sont en option si les barrettes ne sont pas disponibles.
[6] Uniquement nécessaire en cas d'absence de centrifugeuse pour lames.

Équipement	Réf. Greiner Bio-One N°	Quantité
CheckScanner™	862 070	1
Version de base du logiciel CheckReport™	862 080	1
Module d'extension du logiciel CheckReport™ de Pelvo**Check**® CT/NG	862 086	1
Chambre d'hybridation oCheck® avec porte-lame	447 070	1
Poignée magnétique pour porte-lame	447 001	1
Chambre de lavage **oCheck**®[7]	447 020	1

Enzymes requises

- Taq Polymérase : HotStarTaq® ADN polymérase 5 U/µL (impérativement ; Qiagen; 203203, 203205, 203207, 203209)
- Uracil-N-glycosylase : Uracil-ADN glycosylase 1 U/µL (Fermentas ; réf. EN0361, réf. EN0362)
- Protéinase K : 30 mg et 1,8 mL de tampon de protéinase K (uniquement pour le regroupement) (impérativement : Greiner Bio-One, 515 041)

Consommables supplémentaires requis

- Eau de qualité PCR
- Eau purifiée
- Gants à usage unique
- Contrôle AcroMetrix® CT/NG (Life technologies, référence 967146)

Équipement supplémentaire requis

- Micro-centrifugeuse pour microtubes de 1,5 et 2 mL
- Centrifugeuse pour tubes en polypropylène de 50 mL ou centrifugeuse pour lames (par ex. mini-centrifugeuse pour lames de paillasse)
- Micro-centrifugeuse pour microtubes simples de 0,2 mL ou barrettes pour PCR de 8 tubes
- Thermocycleur pour PCR impérativement :
  - GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
  - Thermocycleur à 96 puits Veriti™ (Applied Biosystems)
- Bain-marie (50 °C)
- Micropipettes (différents volumes entre 1 et 1 000 µL)
- Multi-pipette 8 canaux (volume : 5 à 50 µL)
- Pipeteur pour pipettes en verre et en plastique
- Vortex
- Racks pour différents microtubes
- Minuteur
- Container DASRI

Autre matériel requis

- Ordinateur (concernant le système requis, voir les modes d'emploi du scanner CheckSanner™ et du logiciel CheckReport™)

[7] Pour la procédure de lavage de Pelvo**Check**® CT/NG, deux chambres de lavage oCheck® sont nécessaires.

3. EXPÉDITION ET STOCKAGE

L'expédition du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG se fait à température ambiante. Le kit doit toutefois être stocké entre 4 et 8 °C immédiatement après la réception, et protégé de la lumière. Toujours conserver la boîte à lames contenant les puces Pelvo**Check**® CT/NG dans une poche zippée fermée contenant un dessicatif. Tous les composants doivent être stockés dans le conditionnement d'origine du kit afin d'éviter tout mélange de lots avec des dates de péremption différentes.

Lorsqu'ils sont conservés correctement, le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG et ses composants peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption indiquée. Dans ces conditions, la durée de conservation correspond à la date de péremption après la première ouverture du kit et de ses composants.

Le stockage du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG entre 4 et 8 °C peut entraîner la précipitation de sels dans le tampon d'hybridation et le tampon B. Cela ne compromet pas la qualité du produit. Les précipités doivent être dissous avant l'utilisation en ramenant le produit à température ambiante (18 à 25 °C) et en passant le tube/le flacon au vortex ou en l'agitant.

Produit	Stockage
Pelvo**Check**® CT/NG	4 à 8 °C, à l'abri de la lumière

4. CONSIGNES DE SÉCURITÉ

Le kit de test Pelv**oCheck**® CT/NG est réservé à un usage en laboratoire et pas pour la médication, un usage domestique ou d'autres fins. Toujours porter une blouse adaptée, des gants à usage unique et des lunettes de protection et respecter les consignes de sécurité données dans ce chapitre.



Toujours porter une blouse adaptée, des gants à usage unique et des lunettes de protection et respecter les consignes de sécurité données dans ce chapitre et dans le chapitre 7.3.

Informations réglementaires :

Les composants suivants du kit de test Pelv**oCheck**® CT/NG contiennent des substances nocives ou dangereuses :

Composant du kit Quantité Substances dangereuses	Classification conformément au règlement (CE) nº 1272/2008	Pictogramme SGH et mention d'avertissement	Mentions de danger et conseils de prudence	
Tampon d'hybridation Pelv**oCheck**® CT/NG, solution de thyocianate de guanidine, 25 à 50 %, N° CAS 593-84-0	toxicité aiguë, voie orale (catégorie 4), toxicité aiguë, inhalation (catégorie 4), toxicité aquatique chronique (catégorie 3) corrosion cutanée (catégorie 1c)	DANGER	H302 H332 H314 H412	Nocif en cas d'ingestion. Nocif par inhalation. Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
			P273 P280	P273 Éviter le rejet dans l'environnement. P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
			P305+ P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
				Informations supplémentaires concernant le danger (UE) :
			EUH032	Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
Tampon B Pelv**oCheck**® CT/NG, solution de dodécylsulfate de sodium, 10 à 20 %, N° CAS 151-21-3	irritation cutanée (catégorie 2), lésions oculaires graves (catégorie 1)	DANGER	H315 H318	Provoque une irritation cutanée. Provoque des lésions oculaires graves.
			P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage
			P305+ P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

La version actuelle de la Fiche de données de sécurité de ce produit peut être téléchargée sur le site Web de Greiner Bio-One : www.gbo.com/en_INT/know-how-services/download-center.html

5. ÉLIMINATION DES DÉCHETS

Après avoir lavé et séché la puce Pelv**oCheck**® CT/NG, il est possible d'éliminer les solutions de lavage I et II sans précaution particulière. Éliminer la puce Pelv**oCheck**® CT/NG usagée, les composants du kit inutilisés et le mélange d'hybridation inutilisé avec les déchets chimiques du laboratoire. Respecter toutes les réglementations nationales et locales relatives à l'élimination.

6. INTRODUCTION

6.1 Contexte

La maladie inflammatoire pelvienne (MIP) est la complication la plus courante et la plus grave de certaines maladies sexuellement transmissibles (MTS). Elle consiste en une inflammation de l'utérus, des trompes de Fallope et/ou des ovaires qui peut évoluer pour former des cicatrices avec des adhérences avec les tissus avoisinants. Cette maladie peut provoquer des lésions tissulaires aux conséquences graves, comme des douleurs pelviennes chroniques, la formation d'abcès, des grossesses extra-utérines et l'infertilité. Il est difficile d'évaluer l'incidence et la prévalence réelles de la MIP, car les cas subcliniques sont facilement ignorés et cette maladie n'est pas à déclaration obligatoire. Les données provenant de la pratique générale en Angleterre et au pays de Galles permettent d'évaluer une prévalence de la MIP de 1,7 %[8] et le CDC a estimé que chaque année plus de 750 000 femmes aux États-Unis souffrent d'un épisode de MIP aiguë[9].
La plupart des cas de MIP sont provoqués par une transmission sexuelle des agents pathogènes *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (NG). Ces organismes sont des bactéries à Gram négatif non motiles. Les espèces de CT sont intracellulaires strictes et incluent quinze sérotypes (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2 and L3) susceptibles de provoquer des maladies chez l'être humain[10]. Les sérotypes D à K sont les principaux responsables des infections génitales à Chlamydia chez les hommes et les femmes[11]. La détection Pelv**oCheck**® CT/NG est fondée sur l'amplification d'une région fortement conservée du gène 16S d'ARNr. Le test peut donc détecter tous les sérotypes de CT et la variante suédoise contenant une délétion dans le plasmide cryptique de CT.
Les CT/NG remontent du vagin ou du col utérin jusqu'aux organes reproducteurs de la femme. Chez les femmes enceintes, les infections à Chlamydia non traitées peuvent aussi mettre en danger la vie du nouveau-né en provoquant une conjonctivite, une pneumonie atypique et la cécité du nourrisson. La chlamydiose est la MST la plus souvent signalée en Europe[14]. Des études fondées sur des populations ont trouvé une prévalence d'infections à *Chlamydia trachomatis* de 1,4 à 8 % en fonction de la tranche d'âge[12,13]. Les trois quarts de l'ensemble des cas de chlamydiose sont signalés chez les jeunes âgés de 15 à 24 ans[14].
Même si les MST et la MIP peuvent être guéries, leurs effets peuvent être permanents. Ceci montre l'importance de l'identification précoce pour prévenir les effets à long terme et la poursuite de la propagation de l'agent pathogène. Dans ce contexte, la notification au partenaire et le traitement sont des mesures importantes pour éviter toute réinfection et la propagation de la MST.
Au cours des dernières années, plusieurs autorités sanitaires nationales ont démarré des programmes de dépistage de la chlamydiose pour étendre les tests aux adolescents qui présentent le risque le plus élevé d'infection et de développement de MIP[15]. Il est préconisé que toutes les jeunes femmes et les jeunes hommes sexuellement actifs (en Allemagne, pas les hommes) se soumettent à un dépistage de la chlamydiose au moins une fois par an.

---

[8] Simms, I.; Stephenson, J.M. (2000) Pelvic inflammatory disease epidemiology: what do we know and what do we need to know?, Sexually Transmitted Infections 76:80-87

[9] Centre pour le contrôle et la prévention des maladies : http://www.cdc.gov/std/PID/STDFact-PID.htm, dernière consultation de la page : 25 mars 2011, dernière mise à jour de la page : 28 septembre 2011

[10] Schachter, J. 1985. Chlamydiae (Psittacosis-Lymphogranulom a Venereum-Trachoma group), p. 856-862. In E. H. Lennette, *et al*. (éd.), Manual of Clinical Microbiology, 4e éd. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

[11] Yuan, Y., Y-X. Zhang, N. G. Watkins, and H. D. Caldwell. 1989. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia

[12] Adams, E.J. *et al*. (2004) Chlamydia trachomatis in the United Kingdom: a systematic review and analysis of prevalence studies, Sexually Transmitted Infections 80:354-362

[13] Van Bergen, J. *et al*. (2005) Prevalence of urogenital Chlamydia trachomatis increases significantly with level of urbanisation and suggests targeted screening approaches: results from the first national population based study in the Netherlands, Sexually Transmitted Infections 81:17-23

[14] Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), Surveillance Report – Annual epidemiological report 2011, Stockholm, ISBN : 978-92-9193-321-1

[15] Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC), Chlamydia control in Europe – June 2009, Stockholm, ISBN 978-92-9193-165-1

6.2 Utilisation prévue

Le kit Pelvo**Check**® CT/NG est un kit de diagnostic kit qui est prévu pour la détection qualitative et la différentiation de *Chlamydia trachomatis* (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (NG) dans des échantillons d'urine humaine ou des écouvillons vaginaux ou cervicaux. Il doit être utilisé en association avec les équipements indiqués et exclusivement par du personnel qualifié.
Le kit de test n'est pas prévu pour l'analyse d'autres matériels d'échantillons ou pour l'analyse quantitative d'une charge de CT et de NG.

Pelvo**Check**® CT/NG respecte les exigences de la directive relative au diagnostic *in vitro* (98/79/CE), et dispose dès lors du marquage de conformité CE. Tout résultat diagnostique obtenu à l'aide de Pelvo**Check**® CT/NG doit être interprété conjointement avec d'autres résultats cliniques ou de laboratoire.

6.3 Principe du test

Le kit Pelvo**Check**® CT/NG est un kit de test à micro puce destiné à la détection de l'ADN de *Chlamydia trachomatis* (CT) et de *Neisseria gonorrhoeae* (NG). La procédure du test, décrite dans la **Figure 1**, est fondée sur la détection d'un fragment du gène 16S de l'ARNr spécifique de ces agents pathogènes.

Avant l'analyse avec le kit Pelvo**Check**® CT/NG, l'ADN doit être extrait d'un échantillon d'urine ou d'un écouvillon génital. Le prélèvement d'échantillon et l'extraction d'ADN ne font pas partie du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG. Des produits dédiés au prélèvement d'échantillon (kit pré-analytique Pelvo**Check**®) et à l'extraction d'ADN (kit d'extraction d'ADN oCheck®) sont aussi disponibles auprès de Greiner Bio-One et doivent être achetés séparément (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2).

Après extraction de l'ADN génomique bactérien et humain d'un échantillon d'urine ou d'un frottis génital, un fragment de 200-300 bp du gène 16S est amplifié par réaction en chaîne par polymérase (PCR)[16] en présence d'un ensemble d'amorces spécifiques à CT et à NG. Dans le cadre de la même réaction, un fragment du gène humain non répétitif ADAT1 (adénosine déaminase1 spécifique à l'ARNt humain) est amplifié pour surveiller la présence de matériel d'échantillon humain dans l'échantillon d'urine ou le frottis génital (contrôle d'échantillon), et un modèle de contrôle interne présent dans le Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix est amplifié pour surveiller la performance de la PCR (contrôle de PCR). Au cours de la PCR, l'ADN amplifié est marque par fluorescence. Le Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix contient en outre du dUTP. Toute contamination par recirculation potentielle issue des réactions PCR précédentes peut donc être exclue en utilisant un traitement à base d'uracil-n-glycosylase (UNG) (voir le chapitre 8.2.2).

Les produits de PCR sont ensuite hybridés avec des sondes d'ADN spécifiques aux pathogènes et avec des contrôles fixés à la surface de la puce Pelvo**Check**® CT/NG. Chaque puce contient 12 micro-puces ADN, ce qui permet d'analyser simultanément 12 échantillons (échantillons d'urine ou frottis et des échantillons de contrôle négatifs). L'ADN non lié est éliminé aux étapes de lavage suivantes. L'efficacité de l'hybridation est surveillée (contrôle d'hybridation). Enfin, la puce Pelvo**Check**® CT/NG est lue, analysée et évaluée automatiquement, respectivement grâce au scanner CheckScanner™ et au logiciel CheckReport™ (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Le CheckScanner™ est un scanner laser à deux couleurs (longueurs d'onde d'excitation de 532 nm et 635 nm) qui permet de détecter le signal fluorescent généré par la présence de produits d'amplification spécifiques et des contrôles (voir le chapitre 6.4.2). Le logiciel CheckReport™ permet la visualisation, l'analyse et l'évaluation des résultats, et affiche automatiquement les valeurs correspondantes des agents pathogènes détectés et des contrôles dans un rapport détaillé et un rapport succinct.
Le rapport indique clairement la présence ou l'absence de CT et/ou de NG et les contrôles sur puce complets permettent d'obtenir une analyse extrêmement fiable.

[16] Le processus de PCR est couvert par les brevets américains détenus par Hoffmann-La Roche Inc. L'utilisation du processus de PCR nécessite une licence. Aucun élément de la présente publication ne doit être interprété comme constituant une autorisation ou une licence implicite pour l'utilisation du processus de PCR couvert par les brevets détenus par Hoffmann – La Roche Inc.

1. Réaction de PCR

2. Hybridation

3. Lavage et séchage

ou

4. Lecture et analyse

Figure 1 : Procédure du test Pelvo**Check**® **CT/NG**

1. **Réaction de PCR :** Après l'extraction d'ADN, un fragment du gène 16S d'ARNr d'environ 200 à 300 nucléotides et des fragments de deux cibles de contrôle sont amplifiés par PCR en présence d'amorces spécifiques. La sonde fluorescente est introduite pendant la PCR.
2. **Hybridation :** Les produits d'amplification sont ensuite hybridés avec des sondes d'ADN complémentaires présentes dans cinq exemplaires de chaque puce.
3. **Lavage et séchage :** Les produits d'amplification non liés sont éliminés lors des étapes de lavage suivantes.
4. **Lecture et analyse :** La puce Pelvo**Check**® CT/NG est lue, analysée et évaluée à l'aide du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport ™. Un rapport est créé indiquant clairement la présence ou l'absence de *Chlamydia trachomatis* et/ou de *Neisseria gonorrhoeae.*

6.4 Conception de la puce PelvoCheck® CT/NG

6.4.1 Configuration de la puce PelvoCheck® CT/NG

Chaque puce PelvoCheck® CT/NG contient 12 micro-puces nommées de A1 à B6. Chaque micro-puce PelvoCheck® CT/NG comporte 8 sondes différentes et présente un bord surélevé. Chaque sonde est déposée en cinq exemplaires. Trois sondes spécifiques aux types permettent la détection de CT et de NG (NG_1 et NG_2) au moyen du canal rouge (longueur d'onde d'excitation de 635 nm). Quatre contrôles du processus et le contrôle d'impression de tous les spots permettent de surveiller la procédure du test dans le canal vert et le canal rouge (longueurs d'onde d'excitation de 532 et 635 nm). La configuration de la micro-puce PelvoCheck® CT/NG est illustrée dans la **Figure 2** et les contrôles sur puce sont expliqués plus en détail au chapitre 6.4.2.

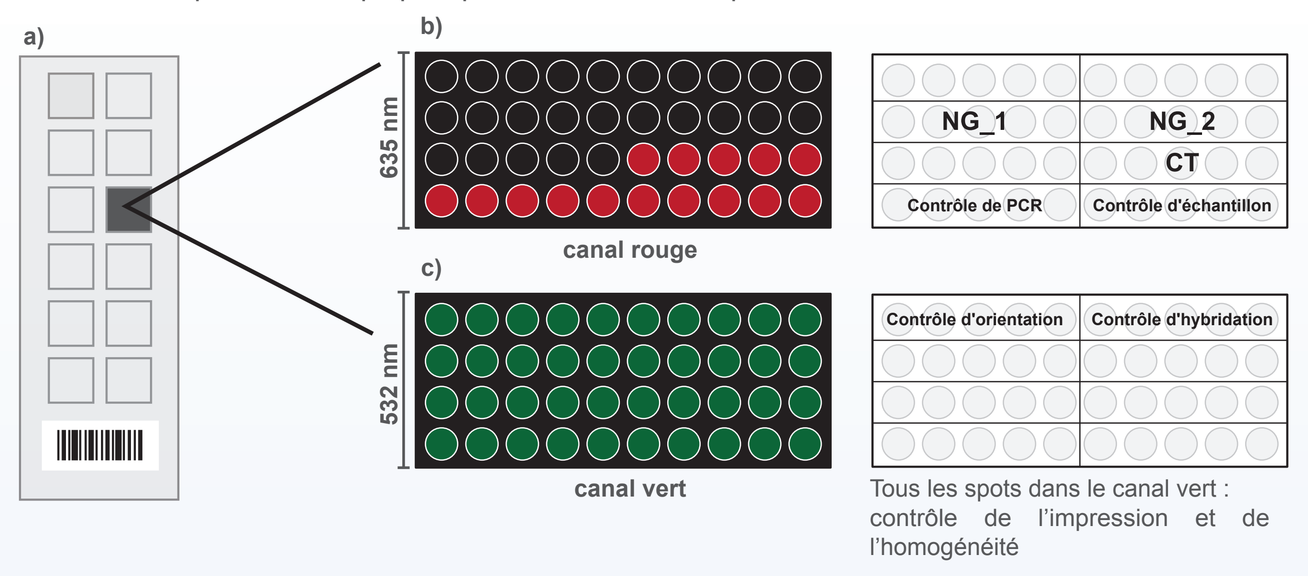


Figure 2 : conception de la puce PelvoCheck® CT/NG
a) Schéma de la puce PelvoCheck® CT/NG avec 12 compartiments indépendants, chacun contenant une micro-puce. **b)** et **c)** Images des micro-puces affichées par le logiciel CheckReport™ pour deux longueurs d'onde d'excitation différentes utilisées pour la lecture du (b) canal rouge : 635 nm ; c) le canal vert : 532 nm) et schémas de la configuration de la puce PelvoCheck® CT/NG. Les sondes spécifiques aux agents pathogènes et les contrôles sur puce sont présentés.

6.4.2 Contrôles sur puce

La configuration de la puce ADN Pelvo**Check**® CT/NG intègre des contrôles sur puce complets. Plusieurs systèmes de contrôle surveillent les étapes clés du processus et du traitement de la puce, y compris la qualité de l'échantillon et l'efficacité de l'extraction d'ADN (contrôle d'échantillon), la performance de la PCR (contrôle de PCR), l'efficacité de l'hybridation (contrôle d'hybridation), ainsi que l'homogénéité et la qualité de l'impression (contrôle d'orientation et contrôle d'impression). Outre la présence ou l'absence de CT et/ou de NG, le logiciel CheckReport™ affiche automatiquement dans un rapport détaillé les valeurs correspondantes des contrôles et les agents pathogènes détectés. Les deux longueurs d'onde d'excitation du scanner CheckScanner™ sont utilisées pour afficher les différents contrôles. Le canal rouge (longueur d'onde d'excitation de 635 nm) sert au contrôle de l'efficacité de l'échantillonnage et de l'extraction d'ADN ainsi qu'à la performance du test (contrôle d'échantillon et de PCR), alors que la qualité de l'hybridation et de la puce (contrôle d'hybridation, d'orientation et d'impression) est évaluée dans le canal vert (longueur d'onde d'excitation de 532 nm).

Canal rouge (longueur d'onde d'excitation de 635 nm)

Contrôle d'échantillon

Pelvo**Check**® CT/NG contrôle la qualité de l'échantillon, de son échantillonnage et/ou de l'extraction d'ADN en amplifiant un fragment du gène humain non répétitif ADAT1 (adénosine déaminase1 spécifique à l'ARNt humain). Si de l'ADN humain est présent en quantité suffisante dans l'ADN extrait de l'échantillon, un signal fluorescent est généré sur les spots de contrôle de l'échantillon.
Si l'amplification de l'ADAT1 est nulle ou insuffisante, le logiciel CheckReport™ indique que le contrôle d'échantillon a échoué. Les conséquences sont doubles, en fonction du signal des spots spécifiques aux agents pathogènes. Si l'échantillon est positif pour CT et/ou NG, l'analyse reste valide. Dans ce cas, le contrôle d'échantillon ayant échoué est un résultat direct de la compétition entre l'ADN humain et un excès d'ADN bactérien pendant la PCR. Si, en revanche, l'échantillon est négatif pour CT et NG, le logiciel CheckReport™ indiquera que l'analyse a échoué en raison d'un mauvais prélèvement de l'échantillon (quantité insuffisante de cellules dans l'échantillon) et/ou d'une extraction inefficace de l'ADN. Dans ce cas, il est recommandé de recommencer l'analyse en commençant par l'extraction d'ADN ou, au besoin, de prélever un nouvel échantillon (voir Résolution des problèmes dans le chapitre 9).

Contrôle de PCR

Pelvo**Check**® CT/NG surveille aussi la performance de la PCR. L'amplification d'un ADN de contrôle interne présent dans le Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix génère un signal sur les spots de contrôle de PCR de la puce Pelvo**Check**® CT/NG. La qualité de la réaction d'amplification est également évaluée automatiquement par le logiciel CheckReport™. Si la performance de la PCR est inférieure à un seuil prédéfini, le logiciel CheckReport™ indique que le contrôle PCR a échoué (« failed ») et l'analyse doit être recommencée (voir Résolution des problèmes dans le chapitre 9). Si la quantité d'ADN bactérien contenue dans l'échantillon est très élevée, le signal fluorescent des spots de contrôle de PCR peut être faible, voire nul, en raison de la compétition qui s'est exercée pendant la PCR. Dans ce cas, le signal fluorescent d'au moins une sonde spécifique aux agents pathogènes doit dépasser un seuil prédéfini pour que le test soit considéré comme valide.

Canal vert (signaux à la longueur d'onde de 532 nm)

Contrôle d'hybridation

Pelvo**Check**® CT/NG contrôle l'efficacité de l'hybridation en utilisant une sonde marquée de fluorescence, contenue dans le tampon d'hybridation Pelvo**Check**® CT/NG, qui s'hybride en séquences d'ADN spécifiques sur la puce Pelvo**Check**® CT/NG. Une hybridation suffisante génère des signaux de fluorescence sur chaque spot de la puce. Les résultats de cinq spots de contrôle d'hybridation sur la puce Pelvo**Check**® CT/NG sont évalués par le logiciel CheckReport™ pour estimer la performance de la réaction d'hybridation.

Contrôle d’impression

La qualité du processus d’impression sur la puce Pelvo**Check**® CT/NG est surveillée par la présence d’un signal de fluorescence au niveau de chaque spot de la puce pour garantir la présence et l’homogénéité de tous les spots.

Contrôle d’orientation

Les spots de contrôle d'orientation de la puce Pelvo**Check**® CT/NG génèrent des signaux de fluorescence, quelle que soit l'efficacité du processus d'hybridation. Le logiciel CheckReport™ utilise ces spots comme des éléments d'orientation pour pouvoir trouver les spots de façon satisfaisante ; il s'agit là d'une condition préalable à l'analyse correcte des signaux.

7. CONDITIONS GÉNÉRALES DE TRAVAIL AVEC PELVOCHECK® CT/NG

7.1 Instructions générales

Lors de la mise en œuvre d'une méthode de pointe actuellement utilisée en biologie moléculaire dans un laboratoire, les instructions suivantes doivent être prises en compte afin de garantir une sécurité maximale pour les laborantins, ainsi que la qualité des résultats.
Les techniques de biologie moléculaire, notamment l'extraction d'ADN, l'amplification et la détection des produits d'amplification, doivent être mises en œuvre par un personnel correctement formé. En outre, des conditions de travail nettes et bien structurées sont indispensables pour éviter des résultats erronés, tels que ceux dus à une dégradation ou à une contamination de l'ADN par les produits d'amplification. À cette fin, il est nécessaire de séparer les zones d'extraction, d'amplification et de détection, comme indiqué au chapitre 7.2. Chaque zone doit être munie d'un équipement, de consommables, de blouses et de gants séparés. Ne jamais transférer les blouses, les gants ou les équipements d'une zone distincte à l'autre.

7.2 Séparation des salles

Il est absolument nécessaire de séparer les zones d'extraction, d'amplification et d'hybridation de l'ADN. Un produit d'amplification ne doit jamais être introduit dans la zone désignée pour l'extraction et le matériel de prélèvement ne doit jamais être introduit dans la zone prévue pour la préparation du mastermix d'amplification.
La **figure 3** illustre la façon dont un laboratoire peut être séparé en trois sections distinctes. L'une des salles est exclusivement utilisée pour l'extraction d'ADN, la deuxième pour la mise en place et la réalisation des réactions de PCR et la troisième pour l'hybridation et l'analyse. Afin d'éviter la contamination des échantillons, chaque salle doit être exclusivement réservée à l'application ou à la technique indiquée. L'utilisation de couleurs peut être avantageuse pour éviter un échange accidentel d'équipements ou de consommables entre les zones.

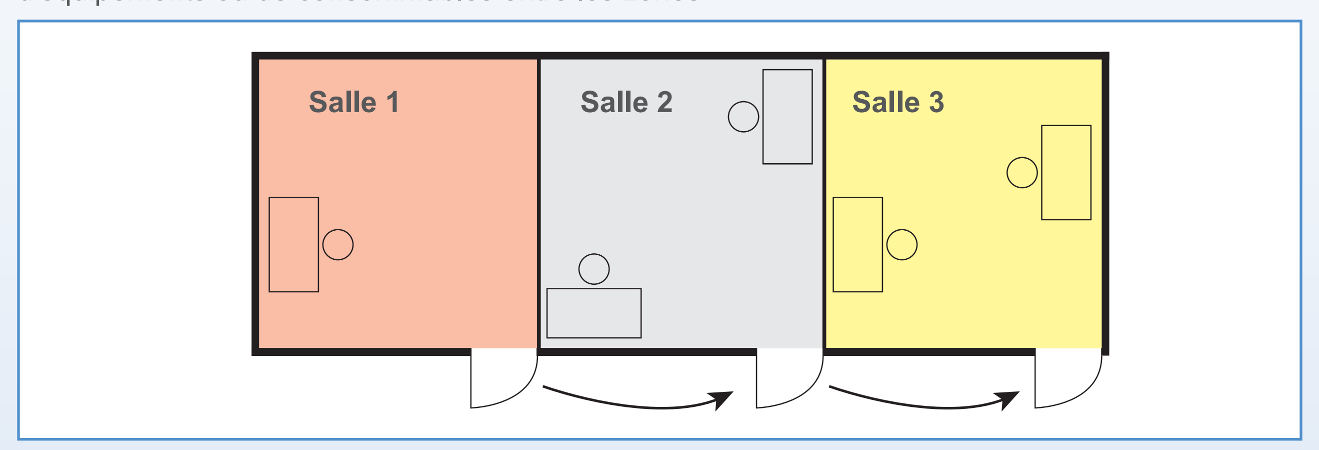


Figure 3 : Séparation des salles

Salle 1 : L'ensemble de la procédure d'extraction d'ADN doit être effectuée dans cette salle.
Salle 2 : Dans cette salle, le mélange réactionnel destiné à la PCR est préparé et aliquoté (idéalement, sous une hotte à PCR). L'ajout des échantillons d'ADN extraits dans la salle 1 doit être effectué dans un espace à part de la salle 2.
Salle 3 : Les étapes de réaction d'hybridation, de lavage et de séchage de la puce ont lieu dans la troisième salle du laboratoire.
De plus, le scanner CheckScanner™ est utilisé conjointement avec le logiciel CheckReport™ pour l'analyse finale du test Pelvo**Check**® **CT/NG**.



Ni l'équipement, ni les consommables ne doivent être interchangés entre les différentes salles et les différents espaces du laboratoire. Ainsi, une duplication de l'équipement et des consommables est nécessaire et doit être prise en compte lors de l'équipement du laboratoire.

7.3 Avertissements et précautions

7.3.1 Prévention de la contamination

- Tout au long de la procédure, une blouse doit être portée et chaque salle du laboratoire doit disposer de ce type de matériel de protection.
- Il faut porter des gants à chaque étape de l'analyse et il faut en changer régulièrement, notamment pendant l'extraction d'ADN.
- L'espace de travail doit être décontaminé à l'aide d'une solution de nettoyage appropriée.
- Ne jamais toucher l'intérieur du bouchon d'un microtube. Pour éviter une contamination croisée, n'ouvrir qu'un seul tube à la fois.
- Utiliser des pointes à filtre pour micropipettes appropriées, équipées d'une barrière aérosole (sans DNase, sans RNase et sans ADN humain). Toujours changer les pointes des pipettes entre les transferts de liquides.

7.3.2 Instructions pour la manipulation des puces ADN

- Les puces ADN doivent être utilisées dans un environnement sans poussière. Le dépôt de poussières et autres particules sur la surface de la puce doit être évité.
- Ne pas toucher la zone d'hybridation située à la surface de la puce.
- Seul le côté étiqueté de la puce est destiné à l'hybridation.
- Ne pas utiliser de marqueurs pour identifier les puces ADN car ils génèrent une fluorescence non spécifique sur la puce.
- Les puces ADN sont exclusivement à usage unique. Les puces hybridées ne peuvent pas être réutilisées.
- Conserver les puces inutilisées dans leur boîte d'origine, à l'intérieur de la poche zippée fournie qui contient un dessicatif.

7.3.3 Précautions générales

- Le présent kit est exclusivement destiné à être utilisé à des fins de diagnostic *in vitro* et ne doit être utilisé que par le personnel formé aux pratiques de laboratoire de diagnostic *in vitro*.
- À réception, vérifier que les composants du kit ne sont pas endommagés. Si l'un des composants (par exemple, les flacons de tampon) est endommagé, contacter le distributeur Greiner Bio-One local. Ne pas utiliser des composants de kit endommagés, faute de quoi les performances du kit pourraient être réduites.
- Ne pas utiliser le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG après la date de péremption.
- Ne pas utiliser de réactifs périmés (par ex., polymérase, Uracil-N-glycosylase).
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Utiliser exclusivement les réactifs/l'équipement fournis avec le kit et ceux recommandés par le fabricant.
- Il est nécessaire de régulièrement étalonner/entretenir les micropipettes, le bain-marie et le bloc chauffant.
- Le pipetage de petites quantités de l'ordre du microlitre est une opération délicate. Il faut dès lors veiller à pipeter avec la plus grande précision possible.
- Pour éviter toute contamination microbienne des réactifs, retirer les aliquots des tubes de réactif avec prudence.
- Toutes les étapes de centrifugation doivent être réalisées à température ambiante (18-25 °C).

7.3.4 Travailler en toute sécurité

- Faire preuve de prudence lors de la manipulation d'échantillons biologiques contenant du liquide biologique humain potentiellement infectieux. Afin de réduire le risque d'infection lié à du matériel potentiellement infectieux, il est recommandé de travailler sous flux laminaire jusqu'à ce que la lyse des échantillons soit terminée. Manipuler et éliminer tous les échantillons biologiques comme s'ils étaient susceptibles de transmettre des agents pathogènes.
- Ne jamais pipeter les solutions à la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ni appliquer de produits cosmétiques dans les zones de travail.
- Éviter tout contact direct avec les échantillons biologiques, ainsi que toute projection des échantillons.
- Toujours porter une blouse, des gants et des lunettes de protection dans le cadre d'un travail avec des échantillons humains.
- Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons et les réactifs.

8. PROCÉDURE D'UTILISATION DU PELVO**CHECK**® CT/NG

Le chapitre suivant décrit en détail les différentes étapes de travail menant *in fine* à l'élaboration d'un rapport détaillé, indiquant clairement la présence ou l'absence de *Chlamydia trachomatis* et/ou de *Neisseria gonorrhoeae* dans chaque échantillon analysé.

La **Figure 4** (voir page 21) présente une vue d'ensemble des différentes étapes de travail à réaliser. Elle illustre également le sous-chapitre correspondant, qui décrit l'étape du test en particulier. Les étapes de travail doivent être menées dans l'ordre indiqué dans ce chapitre. Chaque étape pratique est indiquée par une flèche bleue ➠.



Le prélèvement des échantillons, l'extraction d'ADN et l'analyse avec le logiciel CheckReport™ ne font pas partie du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG. La description de ces étapes de travail est donc abrégée dans ce chapitre. Pour de plus amples informations, consulter les manuels d'utilisation correspondants, par exemple au kit pré-analytique Pelvo**Check**® sur échantillon d'urine, au kit pré-analytique Pelvo**Check**® par écouvillon, au kit d'extraction d'ADN oCheck® et au logiciel CheckReport™.



Veuillez lire attentivement le mode d'emploi. Si vous utilisez déjà le kit de test Papillo**Check**® pour le dépistage du HPV, veuillez repérer les différences entre les protocoles.

➠ Avant d'utiliser, passer au vortex ou agiter et ensuite centrifuger tous les composants liquides du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG pour s'assurer de l'homogénéité des concentrations.

8.1 Prélèvement d'échantillons et extraction d'ADN

8.1.1 Prélèvement d'échantillon

Le prélèvement d'échantillon ne fait pas partie du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG. Deux kits de prélèvement dédiés pour les échantillons d'urine (kit pré-analytique Pelvo**Check**® SAFE /ou STRAW) et un kit pré-analytique pour les frottis vaginaux et cervicaux (kit pré-analytique Pelvo**Check**® SWAB) sont aussi disponibles chez de Greiner Bio-One (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Pelvo**Check**® CT/NG a été validé en utilisant de l'ADN préparé avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® à partir des échantillons d'urine humains prélevés au moyen du kit pré-analytique Pelvo**Check**® SAFE (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) et à partir des frottis vaginaux et cervicaux prélevés au moyen du kit pré-analytique Pelvo**Check**® (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne). Suivre attentivement les instructions détaillées du mode d'emploi du kit pré-analytique Pelvo**Check**®SAFE ou STRAW et du kit pré-analytique Pelvo**Check**® SWAB.

En ce qui concerne l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG à partir d'échantillons d'urine, il faut recueillir le premier jet, correspondant aux 20 à 30 premiers mL du jet d'urine, pour une détection sensible des agents pathogènes. Ceci est particulièrement important pour la détection de CT, qui est un organisme intracellulaire strict, alors que NG est surtout associé aux cellules. En général, le premier jet d'urine contient une quantité abondante de cellules et seul l'échantillonnage de cette fraction permet une analyse Pelvo**Check**® CT/NG sensible conformément aux caractéristiques de performance indiqués.

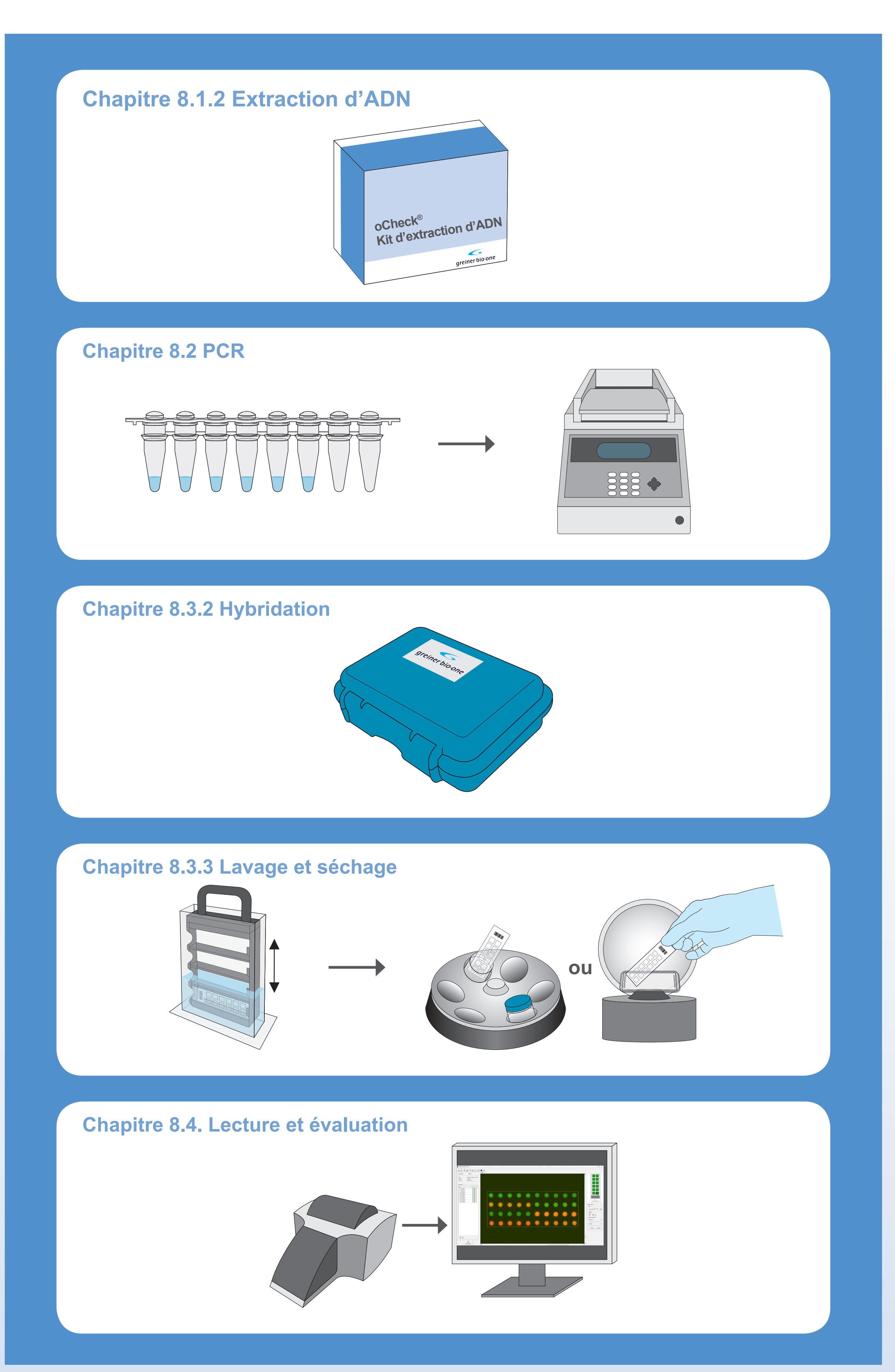


Figure 4 : Vue d'ensemble des différentes étapes de travail du Pelvo**Check**® **CT/NG**

8.1.2 Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN ne fait pas partie du kit de test Pelvo**Check**® CT/NG. Cette procédure doit être effectuée avant l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG, à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck®, également fourni par Greiner Bio-One (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Suivre rigoureusement le mode d'emploi du kit d'extraction d'ADN oCheck®.

Les échantillons d'urine humaine ou les frottis génitaux prélevés

- au moyen du kit pré-analytique Pelvo**Check**® (Greiner Bio-One ; réf. 453 100 ou 453 101) ou
- du kit pré-analytique Pelvo**Check**® SWAB (Greiner Bio-One ; réf. 453 103), respectivement, peuvent être traités directement.

250 µL de solution d'échantillon doivent être utilisés pour extraire l'ADN à l'aide du kit d'extraction d'ADN oCheck®.

Les échantillons d'urine ne peuvent pas être concentrés par centrifugation car le milieu de conservation du kit pré-analytique Pelvo**Check**® (réf. 453 100 ou 453 101) provoque la lyse des cellules.

8.1.3. Contrôle externe de la qualité pour la surveillance de la performance CT/NG

L'échantillonnage, l'extraction d'ADN et l'amplification sont surveillés par les contrôles internes, le contrôle d'échantillon et le contrôle de PCR du Pelvo**Check**® CT/NG (voir le chapitre 6.4.2. Contrôles sur puce). Pour le contrôle de la performance spécifique aux agents pathogènes, il est nécessaire d'ajouter des contrôles externes de qualité.

Le contrôle AcroMetrix® CT/NG (Life technologies, réf. 967 146) est recommandé en tant que contrôle qualité spécifique pour les agents pathogènes. Le contrôle AcroMetrix® CT/NG contient des cellules bactériennes inactivées de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrheae* dans une matrice propriétaire. Les contrôles qualité imitent les pathogènes présents dans la nature et, même s'ils sont inactivés, ils contiennent des cellules bactériennes intactes qui permettent de vérifier l'extraction, la purification et la détection d'acide nucléique bactérien à l'aide de Pelvo**Check**® CT/NG. Les analyses peuvent donc être effectuées en suivant les mêmes instructions que celles pour les échantillons des patients[17].



Pour en savoir plus sur le contrôle AcroMetrix® CT/NG (Life technologies, réf. 967146), consulter les informations du produit. Pour les informations utiles pour la commande, consulter le chapitre 2.

AcroMetrix® CT/NG contient un matériel de contrôle de 20 mL. Pour une utilisation en tant que contrôle qualité de Pelvo**Check**® CT/NG, il est recommandé de préparer 25 µL d'aliquots prêts à l'emploi et de les stocker à -20 °C ou moins. Ne pas recongeler les aliquots et éliminer toute partie non utilisée. Ne pas utiliser AcroMetrix® CT/NG au-delà de la date de péremption indiquée.

Préparer 230 µL du milieu de conservation d'échantillons donné, de l'eau de qualité PCR et ajouter 20 µL de contrôle AcroMetrix® CT/NG pour atteindre un volume final de 250 µL. Continuer conformément au mode d'emploi du kit d'extraction d'ADN/préparation avec une colonne unitaire oCheck® et ensuite au mode d'emploi du Pelvo**Check**® CT/NG (chapitre 8).

[17] Documentation du contrôle AcroMetric® CT/NG numéro MAN0007487 Date d'entrée en vigueur 31 déc 13 Rév. A.00

Si la préparation, l'extraction, l'amplification, l'hybridation et la lecture de l'échantillon ont réussi, le logiciel CheckReport™ évaluera l'analyse du contrôle externe de la qualité comme étant valide et positive pour *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrheae*.



Si les contrôles qualité sont nécessaires en cours de l'analyse des frottis, il est recommande d'utiliser le milieu de conservation d'échantillons d'un nouveau kit d'écouvillonnage Pelvo**Check**® CT/NG (réf. 453 103).

Dans le cas de traitement d'échantillons d'urine, il est recommandé d'utiliser le milieu de conservation d'échantillons d'un nouveau kit pré-analytique Pelvo**Check**® SAFE ou STRAW (réf. 453 100 et 453 101) dilué à 1/3,5 avec de l'eau de qualité PCR (par ex. 80 µL de milieu de conservation d'échantillons + 200 µL d'eau de qualité PCR) pour effectuer des contrôles positifs avec le contrôle AcroMetrix® CT/NG.

S'il n'est pas possible d'utiliser le milieu de conservation de l'échantillon comme indiqué ci-dessus, il est possible d'utiliser à la place de l'eau de qualité PCR pour effectuer les contrôles de performance spécifiques.



L'application du contrôle AcroMetrix® CT/NG en tant que système de contrôle qualité externe est uniquement validé pour le traitement d'échantillons individuels.

8.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est une méthode très sensible qui permet de détecter des quantités d'ADN extrêmement faibles. Des précautions spéciales doivent être observées pour éviter toute contamination de la réaction (voir le chapitre 7). Les enzymes HotStarTaq® polymérase et uracil-N-glycosylase sont nécessaires, mais elles ne sont pas fournies dans le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG et doivent être achetées séparément (voir le chapitre 2).



Le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG a été validé avec la HotStarTaq® polymérase de Qiagen et avec l'uracil-N-glycosylase de Fermentas (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2). Il est impératif d'utiliser ces enzymes pour atteindre les performances établies.

8.2.1 Configuration du thermocycleur

Le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG a été validé avec les thermocycleurs suivants :

- GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems)
- Thermocycleur à 96 puits Veriti™ (Applied Biosystems)



Il est absolument nécessaire d'utiliser l'un des thermocycleurs cités ci-dessus pour atteindre les performances établies.

Le programme du thermocycleur de PCR Pelvo**Check**® CT/NG est résumé dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Programme du thermocycleur de PelvoCheck® CT/NG PCR

Durée	Temp. °C	Nombre de cycles
20 minutes	37 °C	1 (UNG-Hydrolyse)
15 minutes	95 °C	1
30 secondes 60 secondes 30 secondes	94 °C 65 °C 72 °C	45
10 minutes	72 °C	1
Gel	10 °C	∞

En outre, les paramètres d'exécution suivants doivent être définis pour chaque thermocycleur.

Définir le volume de réaction sur 26 µL, la vitesse de rampe sur « 9600 » ou « Max » et la température du couvercle sur 103 °C. Une vitesse de rampe supérieure peut entraîner une performance insuffisante de la réaction de PCR.

Pour savoir comment les configurer, consulter le mode d'emploi du thermocycleur correspondant.

8.2.2 Traitement par uracil-N-Glycosylase (UNG)[18]

Le Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix contient du dUTP, qui est intégré dans les produits d'amplification pendant la PCR Pelvo**Check**® CT/NG ; les produits de PCR risquent donc d'être dégradés par l'UNG. L'UNG coupe le produit de PCR au niveau des sites où un résidu de déoxyuridylate a été incorporé. Les produits de PCR coupés ne seront pas amplifiés dans la réaction suivante. Un traitement UNG peut donc aussi être utilisé pour éliminer une contamination par recirculation liée aux réactions PCR précédentes[19].



Le système UNG intégré dans la PCR Pelvo**Check**® CT/NG n'élimine que la contamination croisée avec les produits de PCR des PCR précédentes. Il est impossible d'éliminer les autres contaminations, survenant par exemple pendant la préparation de l'échantillon, l'extraction d'ADN ou l'ajout de modèle à la réaction PCR. Il est donc toujours nécessaire de suivre les instructions et les précautions particulières pour éviter la contamination décrite au chapitre 7.

L'uracil-N-glycosylase ne fait pas partie du kit Pelvo**Check**® CT/NG et doit être achetée séparément auprès de Fermentas (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2).

- Diluer l'uracil-N-glycosylase à 1/50 dans de l'eau de qualité PCR (la concentration finale est de 0,02 U/µL). Utiliser une nouvelle dilution d'UNG pour chaque préparation de réaction PCR Pelvo**Check**® CT/NG (voir le chapitre 8.2.3). Ne pas réutiliser l'UNG dilué.
- Mélanger soigneusement la dilution d'UNG en la passant au vortex pendant 2 secondes puis en la centrifugeant, ou en la pipetant plusieurs fois.



Le kit de test Pelvo**Check**® CT/NG a été validé avec l'uracil-N-glycosylase de Fermentas (voir le chapitre 2). Il est impératif d'utiliser cette enzyme pour atteindre les performances établies.

- Ajouter 1 µL de cette dilution à chaque réaction PCR Pelvo**Check**® CT/NG (voir le chapitre 8.2.3, **Tableau 2**).



Cette quantité est suffisante pour éliminer la contamination par recirculation de la PCR. Veiller à ne pas utiliser une solution d'UNG plus concentrée car cela pourrait nuire aux performances de la PCR, avec pour résultat une baisse de la sensibilité de Pelvo**Check**® CT/NG.

En général, pour le traitement de l'UNG, le mélange réactionnel de PCR est incubé pendant 20 minutes à 37 °C. L'UNG est par la suite inactivé par une étape d'incubation supplémentaire de 15 minutes à 95 °C. Ces deux étapes sont déjà intégrées dans le PCR Pelvo**Check**® CT/NG PCR et correspondants aux deux premières étapes du programme du thermocycleur (voir le **Tableau 1**, en page 24). L'inactivation de l'uracil-N-glycosylase et l'activation de la HotStarTaq® polymérase se produisent au cours de la seconde étape (15 minutes à 95 °C).

---

[18] L'achat du PelvoCheck® CT/NG s'accompagne d'une licence limitée en vertu des brevets américains n° 5 035 996, 5 683 896, 5 945 313, 6 287 823 et 6 518 026, ainsi que des brevets étrangers correspondants.

[19] Longo, M.C., *et al.* (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions, Gene, 93, 125-128.

8.2.3 Préparation de la PCR

À l'exception de la HotStarTaq® polymérase et de l'uracil-N-glycosylase, le Pelv**oCheck**® CT/NG PCR MasterMix contient déjà tous les composants nécessaires à la PCR (tampon de PCR, $MgCl_2$, dNTP, amorces et modèle de contrôle de PCR).

La HotStarTaq® polymérase ne fait pas partie du kit Pelv**oCheck**® CT/NG et doit être achetée séparément auprès de Qiagen (voir les informations utiles pour la commande au chapitre 2).



Le kit de test Pelv**oCheck**® CT/NG a été validé avec la HotStarTaq® polymérase de Qiagen (voir le chapitre 2). Il est impératif d'utiliser cette polymérase pour atteindre les performances établies.

De manière optimale, la préparation du mélange réactionnel est réalisé dans un environnement protégé, par exemple sous une hotte à PCR, pour éviter toute contamination de la réaction.

- Préparer le mélange réactionnel (composé de Pelv**oCheck**® CT/NG PCR MasterMix, HotStarTaq® polymérase et uracil-N-glycosylase) pour la quantité requise de PCR, comme indiqué dans le **Tableau 2** (voir en page 27).

Pour analyser plusieurs échantillons, le mélange réactionnel doit être préparé en lot (dans la quantité requise pour toutes les analyses). Pour s'adapter aux variations de volume qui surviennent au cours du pipetage, il est recommandé d'augmenter le nombre de réactions (n) de 1 pour chaque puce (= n + 1). Par exemple, préparer un volume de mélange réactionnel pour 13 amplifications si 12 échantillons doivent être testés (voir le **Tableau 2,** page 27).



Il est recommandé d'inclure un contrôle négatif pour chaque lot de Pelv**oCheck**® CT/NG PCR MasterMix préparé. Le tampon d'élution d'ADN provenant du kit d'extraction d'ADN approprié ou de l'eau de qualité PCR peut servir de contrôle négatif.



Toujours utiliser un flacon de Pelv**oCheck**® CT/NG PCR MasterMix pour les réactions d'une puce.

- Mélanger soigneusement le mélange réactionnel en le passant au vortex pendant 2 secondes puis en le centrifugeant, ou en le pipetant plusieurs fois.
- Aliquoter le mélange réactionnel en pipetant **21 µL** pour chaque PCR, dans un microtube pour PCR de 0,2 mL à paroi fine.

Ajouter de l'ADN dans un espace de travail séparé de celui de la préparation du mélange réactionnel (voir le chapitre 7.2).

- Ajouter **5 µl** d'extrait d'ADN pour chaque PCR et mélanger en passant au vortex pendant 2 secondes puis en centrifugeant, ou en pipetant plusieurs fois. Le volume total d'une PCR est de **26 µL**.
- Placer les microtubes dans un thermocycleur et lancer la PCR à l'aide du programme du thermocycleur indiqué dans le chapitre 8.2.1 (voir le **tableau 1,** page 24).



Une fois la PCR terminée, les produits d'amplification doivent être utilisés immédiatement à des fins d'hybridation ou conservés à l'abri de la lumière, à ≤ -20 °C, pendant trois mois maximum, vu que l'activité de l'uracil-N-glycosylase peut-être en partie rétablie à des températures inférieures à 55 °C.

Tableau 2 : Préparation de la réaction de PCR pour le PelvoCheck® CT/NG

	1 réaction	13 réactions (1 puce)	26 réactions (2 puces)	39 réactions (3 puces)	52 réactions (4 puces)
PelvoCheck® CT/NG PCR MasterMix	19,9 µL	258,7 µL	517,4 µL	776,1 µL	1 034,8 µL
HotStarTaq® polymérase (5 U/µL)	0,1 µL	1,3 µL	2,6 µL	3,9 µL	5,2 µL
Uracil-N-glycosylase (Dilution au 1/50, (0,02 U/µL)	1 µL	13 µL	26 µL	39 µL	52 µL
Volume total avant l'ajout de l'ADN dans l'échantillon	21 µL	273 µL	546 µL	819 µL	1 092 µL
ADN extrait de l'échantillon d'urine ou du frottis (matrice d'ADN)	5 µL				
Volume total par réaction	26 µL				

8.3 Hybridation et lavage

8.3.1 Préparation et mise en place

L'hybridation doit être effectuée à température ambiante (18-25 °C). Commencer les préparations nécessaires pour les étapes d'hybridation et de lavage au moins 30 minutes avant de débuter la procédure d'hybridation.

➠ Pour dissoudre les éventuels précipités qui se sont formés dans les tampons d'hybridation et de lavage, exposer ceux-ci à la température ambiante (18-25 °C) pendant 30 minutes et bien mélanger avant utilisation.

Le stockage du kit de test Pelv**oCheck**® CT/NG entre 4 et 8 °C peut entraîner la précipitation de sels dans le tampon d'hybridation et le tampon B. Laisser les solutions s'équilibrer à température ambiante (18-25 °C), puis passer le tube au vortex ou agiter le flacon jusqu'à dissolution du précipité.

➠ Préparer la chambre d'hybridation oCheck® : Placer une serviette en papier neuve et humide dans la chambre d'hybridation et fermer le couvercle pour créer une atmosphère saturée en humidité.

Pour éviter l'évaporation du faible volume de mélange d'hybridation qui se trouve sur la puce, il est nécessaire de réaliser l'hybridation dans une atmosphère saturée en humidité. Une chambre d'hybridation dédiée à l'analyse Pelv**oCheck**® CT/NG est disponible auprès de Greiner Bio-One (voir le chapitre 2).

➠ Incuber la quantité requise de puces Pelv**oCheck**® CT/NG dans la chambre d'hybridation préparée à température ambiante (18-25 °C) pendant au moins 10 minutes.

> **!** Le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation est équipé d'un aimant à l'une de ses deux extrémités seulement. Si moins de quatre puces Pelv**oCheck**® CT/NG doivent être hybridées simultanément, veiller à remplir le porte-lame avec les puces Pelv**oCheck**® CT/NG du côté opposé à l'aimant. Sinon, les puces Pelv**oCheck**® CT/NG ne seront pas recouvertes de liquide au cours de la procédure de lavage.
>
> Conserver les puces Pelv**oCheck**® CT/NG non utilisées dans la boîte à lames du Pelv**oCheck**® CT/NG qui sera conservée dans la pochette en plastique fermée avec le sachet de dessicatif et mise à l'abri de la lumière.

➠ Préparer les solutions de lavage I et II conformément aux instructions suivantes.

Préparation des solutions de lavage I et II :

➠ Préparer le mélange des solutions de lavage I et II en fonction du nombre de puces Pelv**oCheck**® CT/NG analysées, comme indiqué dans le **Tableau 3** (voir page 29).

➠ Aliquoter deux volumes égaux du mélange de solution de lavage dans deux chambres de lavage oCheck® distinctes, et les étiqueter en tant que solutions de lavage I et II. Chaque chambre de lavage oCheck® contient une échelle gravée qui indique la quantité de solution de lavage nécessaire pour 4 puces au maximum. Utiliser cette échelle pour contrôler la quantité de tampon.

➠ Préchauffer la solution de lavage II à 50 °C dans un bain-marie à température contrôlée pendant au moins 20 minutes avant l'utilisation. S'assurer que le niveau de remplissage du bain-marie est égal à celui de la solution de lavage II.

> **!**
>
> Ne jamais réutiliser les solutions de lavage car cela pourrait entraîner une accumulation de produit de PCR rincé pouvant potentiellement interférer avec les résultats du Pelvo**Check**® CT/NG. Utiliser de nouvelles solutions de lavage pour chaque analyse.
>
> Le mélange de solution de lavage préparé au préalable peut être conservé au maximum pendant une semaine à température ambiante (18-25 °C). Vérifier s'il se forme un précipité de SDS. Le cas échéant, réchauffer le mélange de solution de lavage jusqu'à dissolution du précipité et rééquilibrer à température ambiante (18-25 °C). Ensuite, préparer l'expérience d'hybridation suivante.

Tableau 3 : Préparation du mélange de solution de lavage

Les volumes résumés dans ce tableau sont suffisants pour les deux étapes de lavage (solutions de lavage I et II) et pour le nombre indiqué de puces Pelvo**Check**® CT/NG

Composants	Nombre de puces PelvoCheck® CT/NG			
	1	**2**	**3**	**4**
Eau purifiée	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL
Tampon A Pelvo**Check**® CT/NG	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
Tampon B Pelvo**Check**® CT/NG	1,25 mL	2,5 mL	3,75 mL	5 mL
Volume total	111,25 mL	222,5 mL	333,75 mL	445 mL

8.3.2 Hybridation

L'hybridation doit être effectuée à température ambiante (18-25 °C). Les principales étapes de travail pour l'hybridation des produits de PCR pour réaliser la réaction de PCR du Pelvo**Check**® CT/NG sur la puce Pelvo**Check**® CT/NG sont illustrées sur la **figure 5** (voir page 31).

- Mélanger les produits de PCR avant utilisation. Dégyrer un court instant.

Si les produits de PCR ont été conservés à -20 °C jusqu'à l'hybridation, commencer par les décongeler avant de mélanger, puis procéder comme indiqué.

- Passer le tampon d'hybridation au vortex avant utilisation. Dégyrer un court instant.
- Mélanger 30 µL du tampon d'hybridation Pelvo**Check**® CT/NG dans un microtube propre d'une 8 barrettes pour PCR avec 10 µL du produit de PCR, soit en passant au vortex, soit en pipetant plusieurs fois.
- Dégyrer un court instant.
- Transférer 30 µL du mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce en utilisant six canaux d'une pipette multicanaux. Éviter la formation de bulles d'air !

Il est recommandé de traiter six échantillons en parallèle à l'aide d'une multi-pipette 8 canaux et de 8 barrettes pour PCR (voir la **figure 5,** page 31). Cela améliore l'efficacité et la rapidité de la manipulation, ce qui réduit le risque d'évaporation. Si plusieurs lames doivent être traitées en même temps, l'utilisation d'une multi-pipette est requise pour atteindre le temps d'hybridation qui convient. Si possible, hybrider les 12 puits d'une puce. En cas de traitement de moins de 12 échantillons, laisser les puits inutilisés vides. Ces derniers ne pourront toutefois pas être utilisés ultérieurement.



Manipuler la puce avec soin pour éviter de déverser le mélange d'hybridation. Le déversement peut entraîner une contamination croisée des échantillons et générer des faux positifs.

- Incuber la puce pendant exactement 30 minutes à température ambiante (18-25 °C) dans la chambre d'hybridation préparée, dans une atmosphère sombre et saturée en humidité. Veiller à ne pas déplacer la chambre d'hybridation pendant l'hybridation.

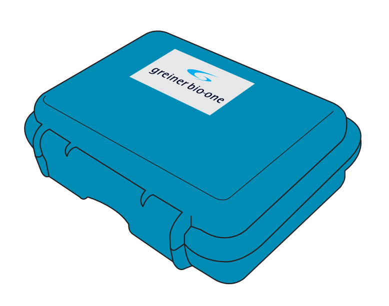


Ne jamais modifier le temps d'incubation ni la température de la réaction d'hybridation, car cela peut provoquer une perte d'intensité du signal de fluorescence ou une hausse de la fluorescence non spécifique.

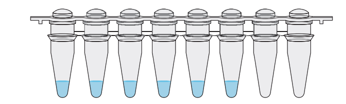
Ne pas exposer les puces hybridées à la lumière directe du soleil.



- Préparer une atmosphère saturée en humidité dans la chambre d'hybridation.
- Incuber la quantité requise de puces Pelv**oCheck**® CT/NG dans la chambre d'hybridation à température ambiante (18-25 °C) (voir le chapitre 8.3.1).



- Mélanger 30 µL du tampon d'hybridation Pelv**oCheck**® CT/NG dans un microtube de 0,2 mL d'une barrette pour PCR avec 10 µL du produit de PCR. Bien mélanger.



- Transférer 30 µL du mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce Pelv**oCheck**® CT/NG en utilisant une pipette multicanaux. Éviter la formation de bulles d'air !



- Fermer la chambre d'hybridation et incuber la puce Pelv**oCheck**® CT/NG pendant exactement 30 minutes à température ambiante (18-25 °C).

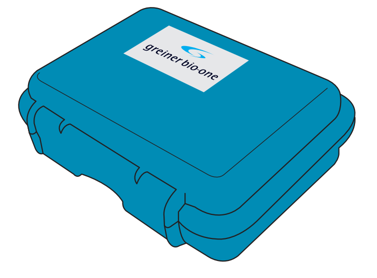


Figure 5 : Étapes de travail de la procédure d'hybridation

8.3.3 Lavage et séchage

L'équipement spécial fourni par Greiner Bio-One permet le lavage simultané de quatre puces Pelvo**Check**® CT/NGu maximum (voir le chapitre 2). L'équipement supplémentaire requis pour traiter les puces Pelvo**Check**® CT/NG se compose de deux chambres de lavage oCheck® et d'une poignée pour le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation.

Les différentes étapes de travail sont illustrées sur la **figure 6** (voir page 33).

- Retirer soigneusement le porte-lame magnétique contenant les lames hybridées de la chambre d'hybridation.
- Déposer le porte-lame contenant les lames directement dans la chambre de lavage oCheck® qui contient la solution de lavage I. Vérifier que le côté magnétique est orienté vers le haut.
- Fixer la poignée oCheck® sur le porte-lame et commencer la première des trois étapes de lavage.
- Laver la puce à température ambiante (18-25 °C) dans la solution de lavage I en la déplaçant rapidement de haut en bas pendant 20 secondes. Les puces doivent toujours rester recouvertes de solution de lavage.
- Laver la puce pendant 30 secondes dans la solution de lavage II à 50 °C en déplaçant vigoureusement le porte-lame de haut en bas.



Éviter que la surface de la puce ne se dessèche pendant la procédure de lavage !

- Éliminer immédiatement tout liquide de la surface de la puce par centrifugation. Si une micro-centrifugation spéciale des micro-puces est utilisée, centrifuger pendant 1 minute. Si une centrifugation pour tubes de 50 mL est utilisée, placer chaque puce Pelvo**Check**® CT/NG lavée dans un tube séparé de 50 mL et centrifuger à température ambiante (18-25 °C) pendant 3 minutes à 500 g.

La puce Pelvo**Check**® CT/NG est maintenant prête à être lue immédiatement. Pour le nettoyage des chambres de lavage oCheck®, rincer plusieurs fois à l'eau après chaque procédure de lavage et de séchage.

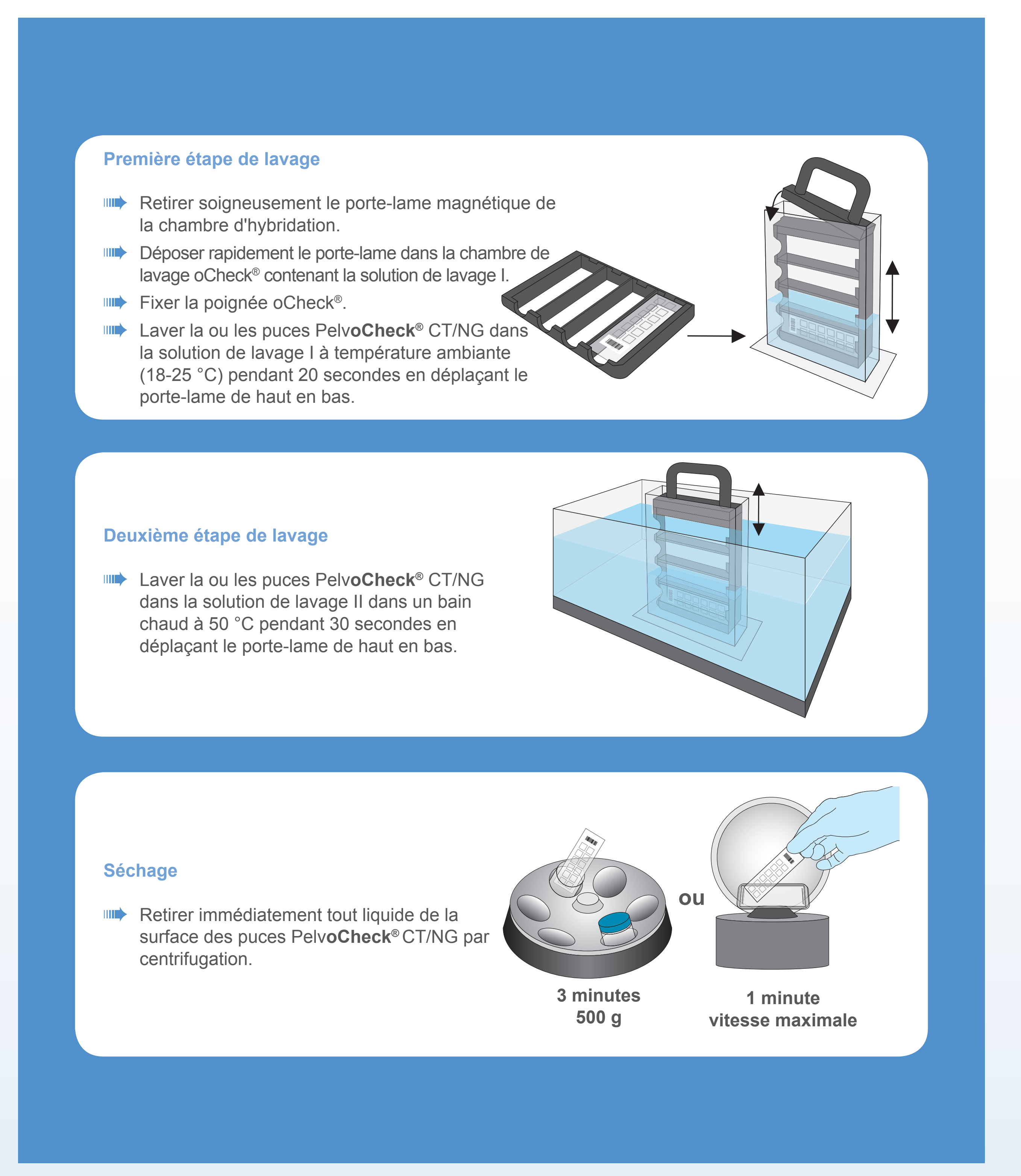


Figure 6 : Étapes de travail de la procédure de lavage
Effectuer les étapes de lavage et de séchage avant la lecture de la puce Pelvo**Check**® CT/NG à l'aide du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™.

8.4 Lecture et évaluation de la puce PelvoCheck® CT/NG

Placer la ou les puces Pelvo**Check**® CT/NG dans le scanner CheckScanner™ et procéder à la lecture de la manière indiquée en détail dans le Guide de l'utilisateur du logiciel CheckReport™.

Pour de plus amples informations sur l'installation du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™, ainsi que sur le système informatique requis, consulter le mode d'emploi du scanner CheckScanner™ et du logiciel CheckReport™.

La dernière version du logiciel peut être téléchargée sur le site Web de Greiner Bio-One :
https://www.gbo.com/en_INT/know-how-services/download-center.html

9. RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

Si l'un des messages d'erreur suivants apparaît pendant la lecture de la puce ou si l'analyse Pelv**oCheck**® CT/NG échoue en raison de contrôles sur puce spécifiques, procéder comme suit. Ne pas hésiter à contacter le distributeur Greiner Bio-One local pour toute question ou difficulté liée à l'utilisation de Pelv**oCheck**® CT/NG. Pour tout problème rencontré lors des autres étapes du test, par exemple, l'extraction d'ADN, se reporter au mode d'emploi correspondant.

PROBLÈME et cause	Commentaires et suggestions
MESSAGE D'ERREUR « COULD NOT READ BARCODE » (IMPOSSIBLE DE LIRE LE CODE-BARRES)	
Code-barres endommagé	Rechercher tout dommage sur le code-barres. Saisir le code-barres à la main lorsque la fenêtre correspondante s'ouvre.
La puce a été mal chargée	Contrôler l'orientation de la puce et la balayer dans le bon sens.
MESSAGE D'ERREUR « MISSING SPOTS » PRINTING CONTROL FAILED OR ORIENTATION CONTROL FAILED (spots manquants, échec du contrôle d'impression ou d'orientation)	
Poussière sur la puce	Recommencer l'hybridation du ou des produits de PCR sur une autre puce.
Formation de bulles d'air pendant le transfert de liquide sur la puce	Recommencer l'hybridation du ou des produits de PCR sur une autre puce. Pipeter soigneusement pour éviter la formation de bulles d'air.
HYBRIDISATION CONTROL FAILED (échec du contrôle d'hybridation)	
Température d'hybridation inadéquate	La bonne température d'hybridation est 20-25 °C. Veiller à respecter les conditions d'hybridation de Pelv**oCheck**® CT/NG. Au besoin, contrôler la température de la salle au moyen d'un thermomètre.
Durée d'hybridation erronée	La durée d'hybridation est de 30 minutes Elle diffère de celle du test Papill**oCheck**®. Veiller à respecter les conditions d'hybridation de Pelv**oCheck**® CT/NG.
Température incorrecte des solutions de lavage	Les étapes de lavages doivent se dérouler à la bonne température : étape de lavage I à 20-25 °C et étape de lavage II à 50 °C. Vérifier la température des deux solutions de lavage et respecter le bon ordre de la procédure.
Température incorrecte du bain-marie	La deuxième étape de lavage doit être effectuée à 50 °C. Vérifier la température du bain-marie. S'assurer que la température de l'eau est réglée sur 50 °C. Au besoin, confirmer la température à l'aide d'une thermomètre.
Mauvaise préparation du mélange d'hybridation	Recommencer la préparation du mélange d'hybridation avec les volumes corrects, puis hybrider les produits de PCR sur une autre puce.
PCR CONTROL FAILED (échec du contrôle de PCR)	
Pas d'ajout de HotStarTaq® ADN polymérase au MasterMix	Recommencer l'analyse Pelv**oCheck**® CT/NG en commençant par la préparation de la PCR.
Ajout de HotStarTaq® ADN polymérase ne fonctionnant pas correctement au MasterMix	Recommencer l'analyse Pelv**oCheck**® CT/NG en commençant par la préparation de la PCR et en utilisant un nouveau lot d'ADN polymérase.

PROBLÈME et cause	Commentaires et suggestions
Ajout d'uracil-N-glycosylase non diluée au MasterMix	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par la préparation de la PCR. Veiller à utiliser de l'uracil-N-glycosylase à la bonne dilution (attention : dans le cas de Pelvo**Check**® CT/NG la dilution est de 1/50. Elle diffère de celle du test Papillo**Check**®).
Mélange insuffisant du mélange réactionnel	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par la préparation de la PCR. Veiller à bien mélanger le mélange réactionnel.
Présence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon	Recommencer l'extraction d'ADN et l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG.
L'hybridation a été effectuée sans ajout de produit de PCR	Recommencer l'hybridation.
Mélange insuffisant du mélange d'hybridation	Recommencer l'hybridation.
Problèmes liés au thermocycleur	Contrôler les performances du thermocycleur et sa programmation (étapes de la PCR, rampe de chaleur et volume). Attention : utiliser uniquement les termocycleurs validés GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)/ Mode 9600 ou thermocycleur à 96 puits Veriti™ (Applied Biosystems)/ Mode 9600 avec Pelvo**Check**® CT/NG.
SAMPLE CONTROL FAILED (échec du contrôle d'échantillon)	
Échec du prélèvement d'échantillon : Matériel d'échantillon insuffisant	Peu de cellules ont été prélevées, voire aucune, pour des raisons potentiellement différentes : (urine) pas de premier jet recueilli, volume d'urine recueilli trop important (effet de dilution), ou l'échantillon n'a pas été bien mélangé avant sa mise en contact avec le milieu de collecte ; (frottis) écouvillonnage insuffisant ou durée du contact trop courte entre le dispositif de prélèvement d'échantillon et le milieu de collecte avant l'extraction d'ADN (libération inefficace de cellules à partir du dispositif de collecte). Recommencer le prélèvement d'échantillon.
Stockage incorrect de l'échantillon	L'ADN de l'échantillon a été dégradé en raison d'un stockage incorrect (température de transport et de stockage, durée de stockage maximale). Recommencer le prélèvement d'échantillon.
Échec de la préparation de l'ADN	Recommencer l'extraction d'ADN. Veiller à bien mélanger l'échantillon avec de procéder à l'extraction d'ADN.
Pas d'ajout d'ADN d'échantillon à l'amplification PCR	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par l'amplification PCR.
PCR AND/OR SAMPLE CONTROLS HAVE NOT FAILED BUT DISPLAY A SNR 635 VALUE OF 0 (les contrôles de PCR et/ou d'échantillon n'ont pas échoué, mais affichent une valeur signal sur bruit 635 nulle)	Ce résultat est jugé valide si le logiciel CheckReport™ détecte au moins un agent pathogène dans l'échantillon et que le signal est supérieur à un seuil défini. Le contrôle d'échantillon et/ou de PCR peut ensuite présenter des signaux de fluorescence faibles, voire nuls, en raison de la compétition qui s'est exercée au cours de la PCR.
CONTAMINATION STATUS OF NEGATIVE CONTROL IS "CONTAMINATED" (l'état de contamination du contrôle négatif est « contaminé »)	
a) Le contrôle négatif du lot d'extraction d'ADN et le contrôle négatif du lot de PCR sont contaminés : **Les réactifs de PCR ont été contaminés**	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par l'amplification d'ADN.

PROBLÈME et cause	Commentaires et suggestions
b) Seul le contrôle négatif du lot d'extraction d'ADN est contaminé : **Les échantillons ont été contaminés pendant l'extraction d'ADN.**	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par l'extraction d'ADN. Si les contrôles négatifs continuent à être contaminés, utiliser un nouveau kit d'extraction d'ADN.
c) Seul le contrôle négatif du lot de PCR est contaminé : **Le contrôle négatif de l'amplification PCR a été contaminé par un déversement d'échantillons positifs**	Recommencer l'analyse Pelvo**Check**® CT/NG en commençant par l'hybridation d'ADN.

10. ASSISTANCE TECHNIQUE

Pour toute question ou difficulté liée aux produits oCheck®, ne pas hésiter à contacter un distributeur Greiner Bio-One local ou directement le service d'assistance technique à l'adresse support.dx@gbo.com. Le personnel du service d'assistance technique de Greiner Bio-One comprend des scientifiques expérimentés disposant d'un savoir-faire pratique et théorique approprié dans le domaine de la biologie moléculaire et des produits oCheck®.

11. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE DE PELVOCHECK® CT/NG

11.1 Performance analytique de PelvoCheck® CT/NG

11.1.1 Limite de détection

La probabilité de détection à 95 % (PD95 %) du test Pelvo**Check**® CT/NG a été déterminée avec des stocks quantifiés d'un fournisseur certifié (DSMZ). Elle a été calculée à partir d'échantillons individuels (équivalents d'urine humaine stabilisée et de frottis).

Table 4 : Pelvo**Check**® CT/NG - Limite de détection

Récapitulatif de la limite de détection de PelvoCheck® CT/NG		
	Échantillon d'urine individuel	Échantillon de frottis individuel
CT	0,3 UFI/mL*	0,4 UFI/mL*
NG	0,9 UFC/mL*	1,7 UFC/mL*

*UFI/mL = unité formant infection par mL et UFC/mL= unité formant colonie par mL

**concerne l'échantillon positif vis-à-vis de CT regroupés avec quatre échantillons d'urine négatifs vis-à-vis de CT

11.1.2 Spécificité analytique pour CT et NG

La détection qualitative de nombres décroissants de copies du génome ADN de CT ou de NG a été effectuée en présence de 10^6 copies/réaction de l'analyte opposé. Dans une deuxième expérience, la détection qualitative de 10 copies du génome ADT de CT ou de NG par réaction a été évaluée en présence de nombres croissants de l'analyte opposé. Tous les tests ont été réalisés trois fois en utilisant trois séries de dilution indépendantes. Pelvo**Check**® CT/NG a la capacité de différencier CT de NG et la spécificité est de 100 %. Pelvo**Check**® CT/NG permet de détecter CT en présence d'une excès de 10 000 fois les copies du génome de NG par réaction et de détecter copies NG en présence d'un excès de 10 000 à 100 000 fois les copies du génome de CT par réaction.

11.1.3 Spécificité analytique d'accompagnement de la flore urogénitale

La spécificité analytique du test Pelvo**Check**® CT/NG a été testée en présence de bactéries, champignons, virus et cellules humaines susceptibles de se trouver dans les voies urogénitales humaines ou d'en être isolés. Chaque isolat a été analysé avec le test Pelvo**Check**® CT/NG en utilisant au moins 1 ng d'ADN génomique par test. Chaque analyse a été réalisée deux fois. Dans le cas de *Treponema pallidum*, la spécificité a été déterminée deux fois : une première fois avec un sérum d'une personne testée positive vis-à-vis de *Treponema pallidum* et une deuxième fois avec 10^5 copies d'un plasmide contenant une copie du fragment du gène16S de l'ARNr de *Treponema pallidum*.

Les organismes non CT et non NG suivants ont été testés au moyen de PelvoCheck® CT/NG. Aucun signal positif n'a été détecté. Ainsi, la spécificité analytique du test PelvoCheck® CT/NG est de 100 % pour les organismes courants dans les voies urogénitales humaines.

Acinetobacter baumannii, Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter lwoffii, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Actinomyces odontolyticus, Actinomyces israelis, Bacillus subtilis, Bacteroides ureolyticus, Bacteroides uniformis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium breve, Campylobacter concisus, Campylobacter gracilis, Campylobacter rectus, Candida albicans, Candida glabrata, Capnocytophaga gingivalis, Capnocytophaga ochracea, Capnocytophaga sputigena, Citrobacter amalonaticus, Citrobacter freundii, Citrobacter koseri, Citrobacter koseri, Chlamydophila psittaci, Chlamydophila pneumoniae, Clostridium difficile, Clostridium perfringens, Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Enterobacter sakazakii, Enterococcus durans, Enterococcus faecali, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Eubacterium nodatum, Fusobacterium nucleatum, Gardnerella vaginalis, Hafnia alvei, Kingella denitrificans, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus iners, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus vaginalis, Mobiluncus muleris, Mogibacterium timidum, Morganella morganii, Mycoplama hominis, Moraxella osloensis, Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma orale, Mycoplosma pneumoniae, Neisseria elongata, Neisseria meningitidis, Neisseria flavescence, Neisseria sicca, Neisseria subflava, Oigella urethralis, Peptoniphilus asaccharolyticus, Peptostreptococcus anaerobius, Peptostreptococcus micros, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens, Proteus hauseri, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Serratia marcescens, Staphylococcus aureus ssp. aureus, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Stenotrophomonas maltophilia, Streptococcus agalactiae, Streptococcus constellatus, Streptococcus criceti, Streptococcus cristatus, Streptococcus gordonii, Streptococcus intermedius, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus oralis, Streptococcus parasanguinis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis, Streptococcus sobrinus, Treponema denticola, Treponema pallidum, Ureaplasma uralyticum, Veillonella parvula, HPV-16.

11.2 Répétabilité

Pour évaluer la répétabilité des tests de Pelvo**Check**® CT/NG, un technicien a analysé des échantillons d'urine humaine inséminés avec CT et NG (PD95 % multipliée par trois) et des échantillons d'urine négatifs, ainsi que des équivalents de frottis inséminés avec CT et NG (PD95 % multipliée par trois) et des équivalents de frottis négatifs conformément au protocole standard du test **oCheck**® CT/NG (voir **Tableau 5**). Les échantillons ont été traités dans un laboratoire en utilisant toujours le même équipement.

Tableau 5 : Pelvo**Check**® CT/NG - Répétabilité

Cible	Matrice	Concen-tration	Type d'échantillon	Nombre d'analyses positives/Nombres total d'analyses		Nombre d'analyses négatives/Nombre total d'analyses négatives pour CT/NG	Répétabilité (%)
				positives pour CT	positives pour NG		
CT et NG	urine humaine	PD95 % multi-pliée par 3	individuel	108/108	108/108	8/8	100
CT			regroupement	100/100	100/100	8/8	100
CT et NG	équiva-lents de frottis		individuel	100/100	99/100	8/8	99-100

Pour tous les échantillons d'urine et chaque analyse répétée, les agents pathogènes ont été détectés et les analyses des échantillons négatifs ont produit des résultats négatifs. Ainsi, la répétabilité de Pelvo**Check**® CT/NG pour les échantillons d'urine est de 100 % avec des échantillons dont la PD95 % est multipliée par trois et les contrôles négatifs pour donner une probabilité d'erreur de 0 %.
Dans le cas des équivalents de frottis, pour tous les échantillons et chaque analyse répétée, CT a été détectée et les analyses des échantillons négatifs ont produit des résultats négatifs pour CT et NG. En ce qui concerne NG, l'un des 100 échantillons positifs vis-à-vis de CT et de NG était négatif vis-à-vis de NG et les analyses des échantillons négatifs étaient négatifs pour les deux agents pathogènes. Ainsi, la répétabilité de Pelvo**Check**® CT/NG pour les équivalents de frottis est de 99-100 % avec des échantillons dont la PD95 % est multipliée par trois et les contrôles négatifs pour donner une probabilité d'erreur de 0-1 %.

11.3 Reproductibilité

La reproductibilité pour le Pelv**oCheck**® CT/NG test kit a été déterminée en utilisant 128 échantillons cliniques contenant des échantillons d'urine et des frottis cervicaux et vaginaux positifs vis-à-vis de CT, positifs vis-à-vis de NG et négatifs vis-à-vis de CT et NG. Dans le cas des échantillons d'urine, des échantillons individuels ont été ensemencés avec des matériels de référence pour la génération d'échantillons doublement positifs. La détermination a été effectuée selon la même méthode et avec les mêmes composants de kit, avec un matériel d'échantillon identique, mais par un personnel différent, dans des laboratoires distincts et à l'aide d'une instrumentation différente. Les résultats ont été considérés comme étant concordants pour les échantillons positifs si des agents pathogènes identiques étaient détectés et, dans le cas des échantillons négatifs, si les analyses étaient valides, mais négatives à propos des agents pathogènes. Pour tous les échantillons cliniques concordants, les résultats ont démontré un accord de 100 % pour les cas positifs et les cas négatifs.

11.4 Robustesse

Les variations des paramètres suivants ont été prises en compte afin d'évaluer la robustesse du système de test Pelv**oCheck**® :

- Quantité de polymérase
- Mode d'accélération du cycleur de PCR
- Variation du type de dispositif
- Quantité de produit de PCR dans l'hybridation
- Volume de tampon d'hybridation
- Température d'hybridation
- Durée d'hybridation
- Température de lavage
- Durée du lavage

Tous les tests ont été effectués trois fois avec trois concentrations du modèle (10^6, 100, et 10 copies de plasmides de CT ou NG par échantillon) et avec une répétition du test. Les plages vérifiées de valeurs de paramètres auxquelles une détection robuste de CT et NG est possible avec Pelv**oCheck**® CT/NG sont résumées dans le **tableau 6**.

Tableau 6 : Robustesse de Pelv**oCheck**® CT/NG

Paramètre	Plage
Quantité de polymérase	0,5-2 unités/rxn
Mode d'accélération	9 600 et Max
Type de dispositif	ABI GenAmp/GenAmp ABI Verity/Verity ABI GenAmp/ABI Verity
Quantité de produit de PCR dans l'hybridation	10 µL ± 5 µL
Volume de tampon d'hybridation	30 µL ± 5 µL
Température d'hybridation	18°-28 °C
Durée d'hybridation	30 minutes ± 15 minutes
Température de lavage de l'étape de lavage à 50 °C	50 °C ± 5 °C
Durée du lavage	1e étape de lavage : 20 secondes ± 10 secondes
	2e étape de lavage : 30 secondes ± 10 secondes

En cas d'amplification de la robustesse, la présence de certaines bactéries courantes en excès dans les voies urogénitales peut entraîner une compétition de l'amplification. Lors de l'analyse pour dépistage de 111 échantillons cliniques de *Bacteroides ureolyticus, Moraxella osloensis, Neisseria meningitides Oigella urethralis et Treponema pallidum*, aucun effet critique susceptible d'avoir influencé le résultat qualitatif de l'analyse Pelv**oCheck**® CT/NG n'a été observé.

De plus, l'éventualité d'un transfert a été étudiée en hybridant des échantillons fortement positifs (10^6 copies de CT ou NG par échantillon) et des contrôles négatifs en alternance selon une disposition en échiquier des puces Pelv**oCheck**® CT/NG. Aucun effet de transfert n'a été observé.

11.5 Performance clinique de Pelv**oCheck**® CT/NG

Les caractéristiques de la performance clinique du test Pelv**oCheck**® CT/NG en termes de concordance positive et négative avec d'autres tests de type NAAT (technique d'amplification des acides nucléiques) ont été déterminées dans deux études cliniques.

La **première étude clinique** a évalué des échantillons d'urine recueillis avec le système de prélèvement recommandé (kit de prélèvement Pelv**oCheck**® SAFE, kit de prélèvement d'échantillons Abbott multi-Collect ou urine native) de 1 649 jeunes femmes âgées de 18 à 25 ans en consultation ou en hôpital gynécologique de jour pour un contrôle de routine (représentant une population typique de dépistage de CT). En outre, 115 échantillons positifs ou négatifs vis-à-vis de NG obtenus lors de dépistages effectués auprès de femmes âgées de 18 à 25 ans fournis par un laboratoire clinique ont été testés. Les 1 649 échantillons d'urine incluaient 50 échantillons ensemencés avec CT en différentes concentrations pour reproduire la distribution de femmes naturellement infectées du fait d'une carence d'échantillons positifs vis-à-vis de CT. La préparation des échantillons a été réalisée pour Pelv**oCheck**® CT/NG avec le kit d'extraction d'ADN oCheck®, pour Roche avec le système MagNA Pure et pour Abbott RealT*ime* CT/NG avec la machine RealTime m2000 conformément aux instructions du fabricant. Les analyses de Pelv**oCheck**® CT/NG ont été comparées aux tests NAAT disponibles dans le commerce (test Roche Cobas® TaqMan® CT) et un PCR hautement sensible pour NG maison (*por A*, pseudo-gène) du partenaire clinique (voir les tableaux 7, 8). Au total, 133 échantillons ont été analysés selon une deuxième méthode de référence, Abbott RealT*ime* CT/NG (voir les tableaux 7,8).

Tableau 7 : Degré de la performance de diagnostic de Pelv**oCheck**® CT/NG comparé aux méthodes de référence pour CT.

Méthode de référence	Critère de qualité	Type d'échantillon	Concordance [%]	Concordance en nombre d'échantillons
Roche Cobas® TaqMan® CT	Concordance positive	urine/individuel	98,8	80/81
	Concordance négative	urine/individuel	99,9	1566/1568
	Concordance totale	urine/individuel	99,8	1646/1649
Abbott RealT*ime* CT/NG	Concordance positive	urine/individuel	98,8	81/82
	Concordance négative	urine/individuel	100,00	51/51
	Concordance totale	urine/individuel	99,2	132/133

Tableau 8 : Degré de la performance de diagnostic de Pelvo**Check**® CT/NG comparé aux méthodes de référence pour NG.

Méthode de référence	Critère de qualité	Type d'échantillon	Concordance [%]	Concordance en nombre d'échantillons
PCR NG maison (gène *porA*)	Concordance positive	urine/individuel	98,2	54/55
	Concordance négative	urine/individuel	95,0	57/60
	Concordance totale	urine/individuel	96,5	111/115
Abbott RealTi*me* CT/NG	Concordance positive	urine/individuel	98,2	56/57
	Concordance négative	urine/individuel	98,3	57/58
	Concordance totale	urine/individuel	98,3	113/115

La comparaison des résultats de Pelvo**Check**® CT/NG et de Roche COBAS® TaqMan® CT, ainsi que de Pelvo**Check**® CT/NG et Abbott RealTi*me* CT/NG démontre une grande concordance des résultats dans 1646/1649 échantillons (99,8 %) et 132/133 échantillons (99,2 %), respectivement. En ce qui concerne le test Abbott RealTi*me* CT/NG en tant que test de référence supérieur, aucun résultat faux positif vis-à-vis de CT n'a été obtenu avec le test Pelvo**Check**® CT/NG ni avec le test Roche COBAS® TaqMan® CT (spécificité de 100 % pour chaque test). La sensibilité du test Pelvo**Check**® CT/NG en termes d'ADN de CT semble être légèrement supérieure comparé à celle de Roche COBAS® TaqMan® CT: 82/83 (98,8 %) par rapport à 81/83 (97,6 %).

En général, l'accord total des résultats obtenus avec le Pelvo**Check**® CT/NG et le *porA* PCR maison (111/115, 96,5 %) ainsi que celui des résultats dérivés des analyses avec Pelvo**Check**® CT/NG et Abbott RealTi*me* CT/NG (113/115, 98.2 %) étaient élevés. La sensibilité du test Pelvo**Check**® CT/NG pour l'ADN de NG était légèrement plus élevée (56/57) que celle du *porA* PCR maison (55/57) (98,2 % contre 96,5 %), probablement en raison d'une sensibilité analytique plus élevée et peut-être des variations des séquences *porA* récemment décrites pour une souche de gonocoques isolée en Australie (Whiley *et al*. 2011, Eurosurveillance). La spécificité du test Pelvo**Check**® CT/NG (57/58) pour l'ADN de NG DNA semble être inférieure à celle du *porA* PCR maison (58/58) (98,3 % contre 100 %). Cette plus faible spécificité repose toutefois seulement sur un résultat positif dans un échantillon ayant obtenu un résultat négatif aussi bien pour le *porA* PCR maison que pour le test Abbott RealTi*me* CT/NG. L'échantillon peut contenir de l'ADN de NG qui ne peut être détecté que par le test Pelvo**Check**® CT/NG, s'il s'agit de celui des tests utilisés dont la sensibilité est la plus élevée, Dans ce contexte, une déclaration récente prétend que la confirmation de tests NAAT positifs peut être difficile si la sensibilité du test de confirmation est inférieure à celle du test initialement utilisé. Ceci est évident lorsque l'échantillon est à la limite du positif et contient uniquement un nombre réduit de copies des séquences cibles (Schachter *et al*. 2006, J Clin Microbiol). C'est la raison pour laquelle les résultats NAAT positifs non confirmés par un autre NAAT ne sont pas nécessairement des faux positifs, mais peuvent représenter aussi des résultats faux négatifs du test de confirmation.

La **deuxième étude clinique** a évalué des frottis cervicaux et vaginaux recueillis avec le système de prélèvement recommandé chez 434 femmes âgées de plus de 18 ans se présentant dans un hôpital de jour spécialisé dans les maladies sexuellement transmissibles. Deux ensembles de frottis cervicaux et vaginaux ont été prélevés : le premier ensemble était recueilli avec les kits de prélèvement correspondants pour les frottis cervicaux et vaginaux recommandés pour l'analyse avec le système de référence Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® (kit de prélèvement d'échantillons cervicaux APTIMA® et kit de prélèvement de frottis vaginaux APTIMA®). Le deuxième ensemble de frottis cervicaux et vaginaux a été obtenu avec le kit d'écouvillonnage Pelvo**Check**® et analysé avec Pelvo**Check**® CT/NG et Abbott RealTi*me* CT/NG.

Pour des motifs de diagnostic, tous les frottis cervicaux et vaginaux recueillis avec les kits de prélèvement Hologic/Gen-Probe recommandés ont été testé avec Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® associé à une machine Hologic/Gen-Probe Panther.
Ensuite, tous les frottis cervicaux et vaginaux ayant fait l'objet d'un prédépistage et positifs vis-à-vis de CT et/ou NG et un sous-ensemble des frottis cervicaux et vaginaux ayant fait l'objet d'un prédépistage et négatifs vis-à-vis de CT and NG ont été analysés avec Pelv**oCheck**® CT/NG et Abbott RealTi*me* CT/NG en utilisant le deuxième ensemble de frottis prélevés avec le kit d'écouvillonnage Pelv**oCheck**®. La préparation des échantillons a été réalisée pour Pelv**oCheck**®CT/NG avec le kit d'extraction d'ADN oCheck® et pour Abbott RealTi*me* CT/NG avec la machine RealTime m2000 conformément aux instructions du fabricant.
L'application du kit d'écouvillonnage Pelv**oCheck**® pour l'analyse des frottis associée avec le Abbott RealTi*me* CT/NG a été testée pour l'étude d'évaluation de la performance clinique. Tous les échantillons testés ont montré la même performance quel que soit le kit de prélèvement utilisé (kit d'écouvillonnage Pelv**oCheck**® ou kit de prélèvement d'échantillons Abbott multi-Collect).
En raison d'une faible prévalence de CT et de NG et d'une faible participation de femmes satisfaisant les critères définis, les frottis cervicaux et vaginaux individuels ayant obtenu un résultat négatif vis-à-vis de CT ou de NG avec Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® ont été enrichis avec du matériel de référence CT et NG reproduisant la distribution naturelle dans les frottis cervicaux et vaginaux. Pour CT, 25 frottis cervicaux et 25 frottis vaginaux et pour NG 46 frottis cervicaux et 44 frottis vaginaux ont été préparés et analysés avec les trois méthodes.

Les résultats obtenus avec Pelv**oCheck**® CT/NG ont été comparés à ceux de Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® et de Abbott RealTi*me* CT/NG. La concordance positive et négative ainsi que la concordance totale ont été calculées (voir les tableaux 9 à 11).

Tableau 9 : Degré de la performance de diagnostic de Pelv**oCheck**® CT/NG comparé aux méthodes de référence pour CT.

Méthode de référence	Critère de qualité	Type d'échantillon	Concordance [%]	Concordance en nombre d'échantillons
Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® (1er ensemble de frottis)	Concordance positive	cervical	96,15	50/52
		vaginal	94,44	51/54
	Concordance négative	cervical	100,00	102/102
		vaginal	100,00	97/97
Abbott RealTi*me* CT/NG (2e ensemble de frottis)	Concordance positive	cervical	98,04	50/51
		vaginal	98,08	51/52
	Concordance négative	cervical	100,00	103/103
		vaginal	100,00	99/99

Tableau 10 : Degré de la performance de diagnostic de Pelvo**Check**® CT/NG comparé aux méthodes de référence pour NG.

Méthode de référence	Critère de qualité	Type d'échantillon	Concordance [%]	Concordance en nombre d'échantillons
Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® (1er ensemble de frottis)	Concordance positive	cervical	100,00	50/50
		vaginal	100,00	49/49
	Concordance négative	cervical	100,00	104/104
		vaginal	100,00	102/102
Abbott RealTi*me* CT/NG (2e ensemble de frottis)	Concordance positive	cervical	98,04	50/51
		vaginal	100,00	49/49
	Concordance négative	cervical	100,00	103/103
		vaginal	100,00	102/102

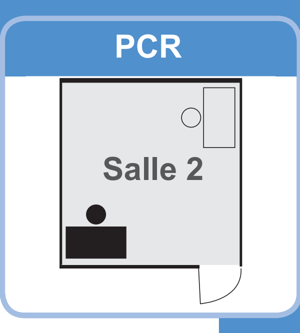
Tableau 11 : Concordance totale des résultats obtenus avec Pelvo**Check**® CT/NG et les méthodes de référence pour tous les échantillons

	Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® x Pelvo**Check® CT/NG**		**Abbott RealTi*me* CT/NG x** Pelvo**Check® CT/NG**		**Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® x Abbott RealTi*me* CT/NG**	
	cervical	vaginal	cervical	vaginal	cervical	vaginal
CT	98,70 %	98,01 %	99,35 %	99,34 %	99,35 %	98,68 %
NG	100,00 %	100,00 %	99,35 %	100,00 %	99,35 %	100,00 %

En général, la concordance totale des résultats obtenu avec les trois méthodes était élevée quels que soient l'agent pathogène et le type de frottis. La concordance totale de Pelvo**Check**® CT/NG avec les résultats obtenus avec les deux méthodes de référence pour CT dans des frottis cervicaux était de 98,70 à 99,35 % et de 98,01 à 99,34 % dans les frottis vaginaux. Dans le cas de NG, la concordance totale de Pelvo**Check**® CT/NG avec les résultats obtenus avec les deux méthodes de référence dans des frottis cervicaux était de 99,35 à 100,00 % et dans les frottis vaginaux de 100 %. La concordance positive (sensibilité) de Pelvo**Check**® CT/NG avec les résultats obtenus avec les deux méthodes de référence pour CT dans des frottis cervicaux était de 96,15 à 98,04 % et de 94,44 à 98,08 % dans les frottis vaginaux. Dans le cas de NG, la concordance totale de Pelvo**Check**® CT/NG avec les résultats obtenus avec les deux méthodes de référence dans des frottis cervicaux était de 98,04 à 100,00 % et de 100,00 % dans les frottis vaginaux.
Un résultat inconsistant entre le test Hologic/Gen-Probe APTIMA Combo 2® et le test Pelvo**Check**® CT/NG ou Abbott RealTi*me* CT/NG peut être le résultat de l'utilisation de deux ensembles différents de frottis, celui d'APTIMA étant toujours prélevé en premier. De plus, la plupart des résultats inconsistants ont montré une alternance de résultats positifs et négatifs caractéristiques des échantillons positifs limites. En revanche, tous les frottis cervicaux et vaginaux ensemencés avec CT ou NG (frottis vrai positifs vérifiable et identiques pour les 3 méthodes) ont obtenu des résultats positifs et aucun résultat inconsistant par rapport aux deux méthodes de référence n'a été détecté.
Aucune analyse n'a révélé des résultats CT ou NG faux négatifs avec Pelvo**Check**® CT/NG ; de ce fait, la concordance négative (spécificité) de Pelvo**Check**® CT/NG était de 100 %.

12. PROCOTOLE COURT PELVOCHECK® CT/NG

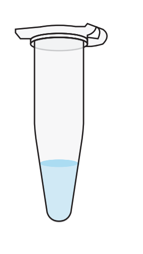
12.1 Salle 2 : PCR - Préparation du mélange réactionnel



!

Préparer de préférence une dilution d'uracil-N-ADN glycosylase et de Pelvo**Check**® CT/NG PCR MasterMix sur une paillasse propre.

- Diluer l'uracil-N-glycosylase dans de l'eau de qualité PCR à **1/50**
- Mélanger soigneusement la dilution UNG



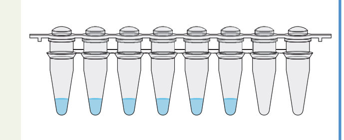
- Préparer le mélange réactionnel pour la quantité requise de PCR

	1 réaction	13 réactions (1 puce)	26 réactions (2 puces)	39 réactions (3 puces)	52 réactions (4 puces)
Pelvo**Check**® **CT/NG PCR MasterMix**	19,9 µL	258,7 µL	517,4 µL	776,1 µL	1 034,8 µL
HotStar Taq® Polymérase (5 U/µL)	0,1 µL	1,3 µL	2,6 µL	3,9 µL	5,2 µL
Uracil-N-Glycosylase (Dilution à 1/50, (0,02 U/µL)	1 µL	13 µl	26 µL	39 µL	52 µL
Volume total avant l'ajout de l'ADN dans l'échantillon	21 µL	273 µL	546 µL	819 µL	1 092 µL



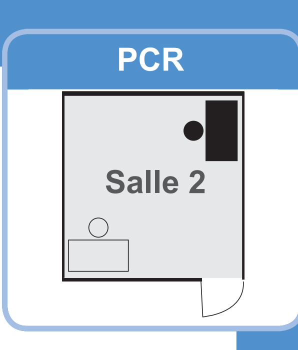
- Mélanger soigneusement le mélange réactionnel

- Aliquoter le mélange réactionnel : ajouter **21 µL** du mélange réactionnel pour chaque PCR dans un microtube pour PCR de 0,2 mL d'une barrette pour PCR

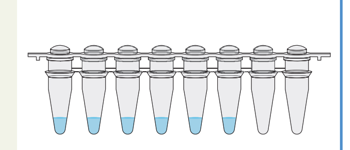


PROTOCOLE COURT

12.2 Salle 2 : PCR - Ajout de la matrice d'ADN / Réaction de PCR



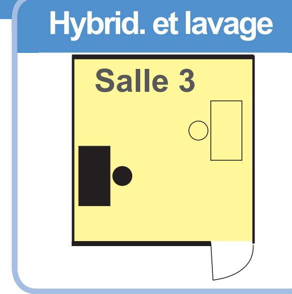
- Ajouter **5 µL** de matrice d'ADN pour chaque PCR
- Bien mélanger



- Débuter la PCR avec le programme préparé du thermocycleur

Durée	Temp. °C	Nombre de cycles
20 minutes	37 °C	1
15 minutes	95 °C	1
30 secondes 60 secondes 30 secondes	94 °C 65 °C 72 °C	45
10 minutes	72 °C	1
Gel	10 °C	





12.3 Salle 3 : Hybridation - Préparation / Réaction d'hybridation

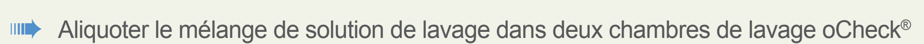
!

Commencer les préparations au moins 30 minutes avant l'hybridation.

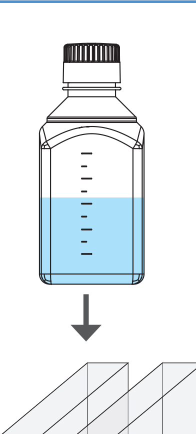
- Stabilisation des tampons d'hybridation et de lavage
- Préparation de la chambre d'hybridation
- Pré-incubation des puces
- Préchauffage du bain-marie à 50 °C
- Préparation des solutions de lavage

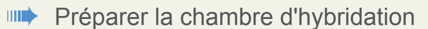
- Dissoudre les éventuels précipités qui se sont formés dans les tampons d'hybridation et de lavage en les exposant à la température ambiante (18-25 °C) et bien mélanger
- Préparer le mélange de solution de lavage pour la quantité de puces Pelv**o**Check® CT/NG à analyser.

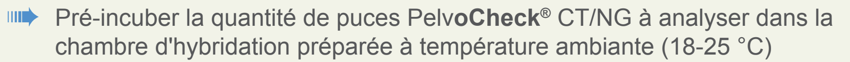
	Nombre de puces PelvoCheck® CT/NG			
Composants	**1**	**2**	**3**	**4**
Eau purifiée	100 mL	200 mL	300 mL	400 mL
Tampon A PelvoCheck® CT/NG	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
Tampon B PelvoCheck® CT/NG	1,25 mL	2,5 mL	3,75 mL	5 mL
Volume total	111,25 mL	222,50 mL	333,75 mL	445 mL

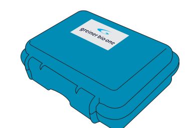

- Aliquoter le mélange de solution de lavage dans deux chambres de lavage oCheck®


- Préchauffer la solution de lavage II au bain-marie à **50 °C**

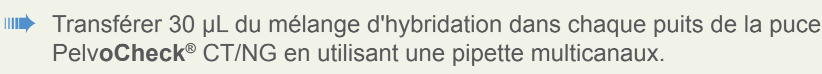



- Préparer la chambre d'hybridation


- Pré-incuber la quantité de puces Pelv**o**Check® CT/NG à analyser dans la chambre d'hybridation préparée à température ambiante (18-25 °C)

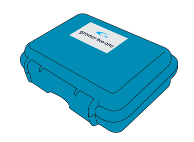



- Mélanger les produits de PCR et les dégyrer un court instant
- Mélanger le tampon d'hybridation et le dégyrer un court instant
- Mélanger 30 µL du tampon d'hybridation Pelv**o**Check® CT/NG dans un microtube pour PCR de 0,2 mL avec 10 µL du produit de PCR.
- Bien mélanger et dégyrer un court instant

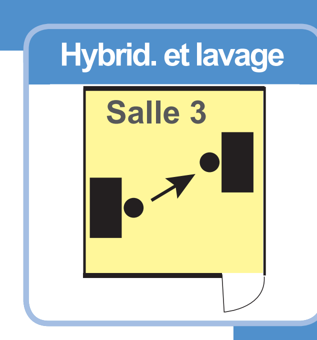

- Transférer 30 µL du mélange d'hybridation dans chaque puits de la puce Pelv**o**Check® CT/NG en utilisant une pipette multicanaux.
- Éviter la formation de bulles d'air



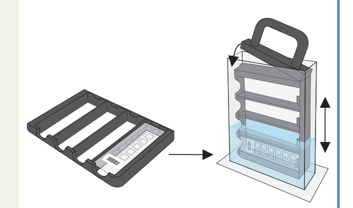
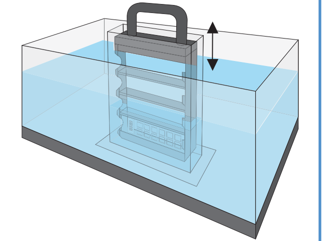
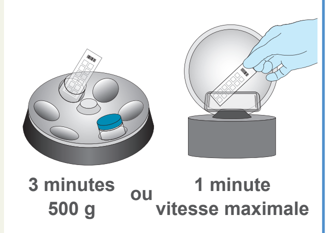

- Incuber la puce Pelv**o**Check® CT/NG pendant exactement 30 minutes, à température ambiante (18-25 °C)



PROTOCOLE COURT



12.4 Salle 3 : Lavage et séchage/ Lecture et évaluation

- Retirer le porte-lame magnétique de la chambre d'hybridation - Poser le porte-lame dans la chambre de lavage oCheck® contenant la solution de lavage I - Fixer la poignée oCheck® - Laver la ou les puces Pelvo**Check**® CT/NG dans la solution de lavage I à température ambiante (18-25 °C) pendant 20 secondes	
- Laver la ou les puces Pelvo**Check**® CT/NG dans la solution de lavage II préchauffée au bain-marie à 50 °C pendant 30 secondes	
- Retirer tout liquide de la surface de la puce Pelvo**Check**® CT/NG par centrifugation	
- Lire la ou les puces Pelvo**Check**® CT/NG à l'aide du scanner CheckScanner™ - Effectuer une lecture et une analyse de la manière indiquée dans le mode d'emploi du logiciel CheckReport™ - Créer des rapports	